

**Untersuchungen zur Biosynthese von Flavoglaucin, Echinulin und
ihren Analoga im Ascomyceten *Aspergillus ruber***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. Nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

MSc Jonas Nies
aus Schotten

Marburg an der Lahn, 2021

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 2016 bis Dezember 2020 im Institut für pharmazeutische Biologie und Biotechnologie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Shu-Ming Li durchgeführt.

Eingereicht am: 21.04.2021

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2021

Erstgutachter: Prof. Dr. Shu-Ming Li

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen

Hochschulkennziffer: 1180

Für meine Familie

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Untersuchungen zur Biosynthese von Flavoglaucin, Echinulin und ihren Analoga im
Ascomyceten *Aspergillus ruber*“

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und dabei keine anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen oder Hilfsmittel benutzt habe. Des Weiteren sind alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet.

Diese Dissertation wurde in vorliegender oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht.

Marburg, den 21.04.2021

.....

(Jonas Nies)

Inhaltsverzeichnis

Publikationen und Tagungsbeiträge	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung	IX
Summary	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Pilze, ihre Naturstoffe und ihre Beziehung zur Menschheit	1
1.1.1 Der Einfluss von Pilzen auf den Menschen	1
1.1.2 Pilzliche Naturstoffe und ihre Rolle in der Beziehung zwischen Mensch und Pilz.....	3
1.2 Ascomyceten	6
1.3 Die Gattung <i>Aspergillus</i>	7
1.4 <i>Aspergillus ruber</i> und seine Sekundärmetabolite	8
1.4.1 Flavoglaucin und Analoga.....	10
1.4.2 Indolalkaloide der Echinulin-Familie	11
1.4.3 Kondensationsprodukte der Flavoglaucin-, Echinulin- und Anthrachinonderivate	13
1.5 Sekundärmetabolite, biosynthetische Gencluster (BGCs) und Genome Mining	14
1.5.1 Primär- und Sekundärstoffwechsel	14
1.5.2 Biosynthetische Gencluster (BGCs)	15
1.5.3 Entdeckung von BGCs und neuen Sekundärmetaboliten durch Genome Mining	16
1.5.4 Strategien zur Untersuchung von BGCs und ihren Sekundärmetaboliten.....	18
1.5.5 Heterologe Expression von BGCs in Modellorganismen	20
1.6 Enzyme der Sekundärmetabolitbiosynthese.....	21
1.6.1 Polyketide und Polyketidsynthasen (PKS)	21
1.6.1.1 Modulare Typ I-PKS	24
1.6.1.2 Iterative Typ I-PKS – Nicht-reduzierende PKS	25
1.6.1.3 Iterative Typ I-PKS – Partiiell-reduzierende PKS	27
1.6.1.4 Iterative Typ I-PKS – Hoch-reduzierende PKS	28
1.6.1.5 Typ II-PKS	29
1.6.1.6 Typ III-PKS	31
1.6.2 Nicht-ribosomale Peptide und nicht-ribosomale Peptidsynthetasen.....	32
1.6.3 Isoprenoide, prenylierte Substanzen und Prenyltransferasen	36
1.6.3.1 Isoprenoide, ihr Ursprung und <i>trans-/cis</i> -Prenyltransferasen	36
1.6.3.2 Membran-gebundene aromatische Prenyltransferasen – UbiA-PTs	39
1.6.3.3 Lösliche aromatische Prenyltransferasen – ABBA-PTs.....	40
1.6.3.4 Lösliche aromatische Prenyltransferasen – DMATS-PTs.....	41
1.6.4 Pilzliche Cytochrom P450 Enzyme (CYPs).....	43
1.6.4.1 Verbreitung und Diversität von CYPs	43

1.6.4.2	Klassifizierung pilzlicher CYPs nach Redoxpartner	44
1.6.4.3	Katalytischer Zyklus der CYP-Reaktionen	46
1.6.4.4	Aromatische Hydroxylierung und Dehydrogenierung katalysiert durch CYPs.....	47
2	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	51
3	Material und Methoden	53
3.1	Geräte, Chemikalien und Puffer	53
3.1.1	Chemikalien	53
3.1.2	Geräte	53
3.1.3	Vorgepackte Säulen und Säulenmaterial für die Chromatographie	55
3.1.4	Puffer und Lösungen	55
3.1.5	Sterilisation	55
3.2	Verwendete Materialien und Organismen.....	55
3.2.1	Molekularbiologische Kits	55
3.2.2	Enzyme	55
3.2.3	Vektoren	56
3.2.4	Längen und Molekulargewichtstandards	59
3.2.5	Oligonukleotidprimer	59
3.2.6	Organismen	68
3.3	Nährmedien und Supplementlösungen	70
3.3.1	Nährmedien für <i>Escherichia coli</i>	70
3.3.2	Nährmedien für die Kultivierung von Ascomyceten	71
3.3.3	Nährmedien zur Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72
3.3.4	Antibiotika	73
3.3.5	Supplementlösungen und Auxotrophiemarker.....	74
3.4	Kultivierung von Mikroorganismen	74
3.4.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	74
3.4.2	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
3.4.3	Kultivierung von <i>Aspergillus ruber</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> und <i>Aspergillus cristatus</i> ...	75
3.4.4	Kultivierung von <i>Aspergillus nidulans</i>	75
3.5	Molekularbiologische Methoden	75
3.5.1	Isolierung chromosomaler DNA aus Ascomyceten	75
3.5.2	Schnelle Isolierung geringer Mengen chromosomaler DNA aus <i>A. nidulans</i>	76
3.5.3	Isolierung von mRNA aus <i>A. ruber</i> und cDNA-Synthese	77
3.5.4	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	77
3.5.5	Transformation chemisch-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	77
3.5.6	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nach der LiOAc-Methode.....	78
3.5.7	Transformation von <i>Aspergillus nidulans</i>	78
3.5.8	Transformation von <i>Aspergillus ruber</i>	79

3.5.9	Reinigung und Konzentration von DNA mittels Ethanol-Präzipitation	80
3.5.10	Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung und Sequenzierung von DNA	80
3.5.11	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	80
3.5.12	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	80
3.5.13	Plasmidisolierung aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81
3.5.14	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen	82
3.5.15	Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente	82
3.5.16	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	82
3.5.17	Klonierung von Plasmiden via Homologer Rekombination (HR)	83
3.6	Proteinanalytische und -biochemische Methoden	83
3.6.1	<i>E. coli</i> -Zellaufschluss über Ultraschall	83
3.6.2	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	84
3.6.3	Ultrafiltration zur Aufkonzentrierung von löslichen Proteinen	85
3.6.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	85
3.6.5	Isolierung von rekombinanten Proteinen über Ni-NTA-Agarose.....	85
3.6.6	Präparative Größenausschlusschromatographie	86
3.6.7	<i>In Vitro</i> -Enzymassays	86
3.7	Fütterungsexperimente	87
3.7.1	Fütterungsexperimente mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
3.7.2	Fütterungsexperimente mit <i>Aspergillus nidulans</i>	87
3.8	Extraktion und Isolierung von Sekundärmetaboliten	87
3.8.1	Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Reiskulturen.....	87
3.8.2	Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Flüssigkulturen	88
3.8.3	Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Extrakten	88
3.9	Analytische Methoden.....	88
3.9.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie (LC-MS)	88
3.9.2	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	89
3.10	Bioinformatische Methoden.....	89
3.10.1	Bioinformatische Analyse von Genomen zur Identifikation potenzieller BGCs.....	89
3.10.2	Alignment von Sequenzen.....	89
3.10.3	Curve-Fitting mit GraphPad Prism.....	89
4	Ergebnisse.....	91
4.1	Untersuchungen zur Flavoglaucin-Biosynthese in <i>Aspergillus ruber</i> QEN-0407-G2	91
4.1.1	Produktion von Flavoglaucin und seinen Analoga in Pilzen der <i>Aspergillus glaucus</i> -Gruppe	91
4.1.2	Entdeckung und bioinformatische Analyse des potenziellen Genclusters für die Flavoglaucinbiosynthese	92

4.1.3	Deletion einzelner <i>fog</i> -Gene in <i>Aspergillus ruber</i> QEN-0407-G2 mit der Split-Marker Methode	96
4.1.3.1	Test der Sensitivität von <i>Aspergillus ruber</i> QEN-0407-G2 gegenüber Hygromycin B.....	97
4.1.3.2	Optimierung der Protoplastierungsbedingungen	98
4.1.3.3	Klonierung der Split-Marker Deletionskonstrukte	101
4.1.3.4	Transformation von <i>Aspergillus ruber</i> QEN-0407-G2 mit den Deletionskonstrukten pJN006 – pJN009	102
4.1.4	Heterologe Expression des <i>fog</i> -Clusters in <i>Aspergillus nidulans</i> LO8030	104
4.1.4.1	Herstellung des Negativkontrollstamms <i>A. nidulans</i> JN002	105
4.1.4.2	Klonierung und heterologe Expression des <i>fog</i> -Cluster in <i>Aspergillus nidulans</i> LO8030	105
4.1.5	Biosynthese der ersten aromatischen Vorstufe von Flavoglaucin und seine Hydroxylierung	108
4.1.5.1	Heterologe Expression der HR-PKS <i>FogA</i> in <i>Aspergillus nidulans</i> LO8030	108
4.1.5.2	Deletion von <i>fogA</i> in <i>Aspergillus nidulans</i> JN004	112
4.1.5.3	Deletion der Gene <i>fogB</i> , <i>fogC</i> , <i>fogD</i> und <i>fogG</i> in <i>Aspergillus nidulans</i> JN004	115
4.1.5.4	Deletion von <i>fogE</i> in <i>Aspergillus nidulans</i> JN004	121
4.1.5.5	Heterologe Expression von <i>fogABCDI</i> ohne modifizierende Enzyme in <i>Aspergillus nidulans</i> LO8030	124
4.1.6	Prenylierung der 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkoholintermediate und ihre spontante Oxidation zu Chinonen.....	128
4.1.6.1	Deletion von <i>fogH</i> in <i>Aspergillus nidulans</i> JN004.....	128
4.1.6.2	<i>FogH</i> <i>in vitro</i> -Assays und Stabilität der 2-Heptyl-3,6-Dihydroxybenzylalkohol-Intermediate.....	130
4.1.7	Reoxidation der prenylierten Salicylalkoholintermediate zum finalen Aldehyd	133
4.1.7.1	Deletion von <i>fogF</i> in <i>Aspergillus nidulans</i> JN004	133
4.1.7.2	Fütterungsexperimente mit dem heterologen <i>fogF</i> -Expressionsstamm <i>Aspergillus nidulans</i> JN025	136
4.1.8	Positive Regulation der Flavoglaucinbiosynthese durch <i>FogI</i>	140
4.1.8.1	Deletion von <i>fogI</i> in <i>Aspergillus nidulans</i> JN004	140
4.2	Untersuchungen zur Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie	143
4.2.1	Bioinformatische Analyse des Genclusters für die Echinulin-Biosynthese	143
4.2.2	Produktion von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie in <i>Aspergillus ruber</i> QEN-0407-G2	144
4.2.3	Heterologe Expression des <i>ech</i> -Clusters in <i>Aspergillus nidulans</i> LO8030.....	146
4.2.4	Identifikation der produzierten Substanzen	150
4.2.5	Erweiterung des <i>ech</i> -Clusters um mögliche Oxidoreduktasegene in <i>Aspergillus nidulans</i> JN019.....	153
4.2.6	Die Rolle von <i>EchP450</i> in der Biosynthese von Alkaloiden der Echinulin-Familie ...	156
4.2.6.1	Heterologe Expression von <i>echP450</i> in <i>Escherichia coli</i>	156
4.2.6.2	Heterologe Expression von <i>echP450</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	160

4.2.6.3	Fütterungsexperimente mit dem <i>ech</i> -Clusterexpressionsstamm <i>Aspergillus nidulans</i> JN042.....	163
4.2.7	EchPT2 prenyliert bevorzugt Substrate der Echinulin-Serie	166
4.2.7.1	EchPT2- <i>in vitro</i> -Assay mit konkurrierenden Substraten	166
4.2.7.2	Substratkonzentration-abhängige Produktbildung durch EchPT2.....	168
5	Diskussion.....	171
5.1	Untersuchungen zur Flavoglaucinbiosynthese.....	171
5.1.1	Flavoglaucinanaloga in <i>Aspergillus ruber</i> QEN-0407-G2 und die heterologe Expression des <i>fog</i> -Clusters in <i>Aspergillus nidulans</i> LO8030	171
5.1.2	Identifikation von <i>fog</i> -Cluster Homologen in anderen Organismen.....	172
5.1.3	Biosynthese des ersten aromatischen Intermediaten	173
5.1.4	Hydroxylierung der 2-Alkyl-Salicylalkoholintermediate durch FogE.....	178
5.1.5	Spontane Oxidation der 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkoholintermediate zu Chinonen und <i>vice versa</i>	178
5.1.6	Prenylierung der 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkoholintermediate durch FogH und Bedeutung der Hydroxymethylgruppe am Aromaten	180
5.1.7	Reoxidation der prenylierten 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkoholintermediate zu den finalen Aldehyden durch FogF	181
5.1.8	Aktuelles Verständnis der Flavoglaucinbiosynthese in <i>A. ruber</i>	182
5.2	Untersuchungen zur Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie.....	184
5.2.1	Heterologe Expression und Erweiterung des <i>ech</i> -Cluster in <i>Aspergillus nidulans</i> ..	184
5.2.2	Heterologe Expression von <i>echP450</i> in <i>Escherichia coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	185
5.2.3	EchP450 katalysiert nur die Einführung der Δ^{10} -Doppelbindung in Preechinulin...	186
5.2.4	EchPT2 prenyliert bevorzugt Substrate ohne Δ^{10} -Doppelbindung	187
5.2.5	Aktuelles Verständnis der Echinulinbiosynthese in <i>A. ruber</i>	188
6	Perspektiven zur Weiterführung der Projekte	191
6.1	Biosynthese von Flavoglaucinanaloga	191
6.2	Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie.....	192
	Literaturverzeichnis	194
	Anhang	214
	Anhang 1: ^1H -NMR-Spektren der isolierten Substanzen der Echinulin-Familie	214
	Anhang 2: LC-MS Analysen von Substanzen der Echinulin-Familie	219
	Anhang 3: HPLC-Analysen der Substanzen 16, 19, 16a und 17a als Standards.....	221
	Danksagungen	223
	Einverständniserklärung.....	225

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

Nies, J., Li, S.-M., **2021**. Prenylation and Dehydrogenation of a C2-Reverse Prenylated Diketopiperazine as a Branching Point in the Biosynthesis of Echinulin Family Alkaloids in *Aspergillus ruber*. *ACS Chem. Biol.* 16, 185–192.

Nies, J.*, Ran, H.*, Wohlgemuth, V., Yin, W.-B., Li, S.-M., **2020**. Biosynthesis of the Prenylated Salicylaldehyde Flavoglucin Requires Temporary Reduction to Salicyl Alcohol for Decoration before Reoxidation to the Final Product. *Org. Lett.* 22, 2256–2260.

* equal contribution

Kindinger, F., Nies, J., Becker, A., Zhu, T., Li, S.-M., **2019**. Genomic Locus of a *Penicillium crustosum* Pigment as an Integration Site for Secondary Metabolite Gene Expression. *ACS Chem. Biol.* 14, 1227–1234.

Tagungsbeiträge

Nies, J., Kindinger, F., Xiang, P., Li, S.-M., **2019**. *Aspergillus nidulans* as a heterologous expression platform for the investigation of fungal secondary metabolite biosynthetic pathways. Poster-präsentation und Kurzvortrag auf den 31. Irseer Naturstofftagen, 20. – 22.02.2019.

Abkürzungsverzeichnis

1,6-DHN	1,6-Dihydroxynaphtalen
6-MSA	6-Methylsalicylsäure (<i>6-methyl salicylic acid</i>)
α KG-NHFe	α -Ketoglutarat-abhängiges nicht-Häm Eisen-Enzym
AA	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
ACP	Acyl-Carrier-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARO	Aromatase
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BGC	biosynthetischer Gencluster
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
CDO	Cyclodipeptidoxidase
CLF	Kettenlängenfaktor (<i>chain length factor</i>)
CoA	Coenzym A
CoQ	Coenzym Q
CPR	NADPH-Cytochrom P450-Reduktase
C-terminal	Carboxy-terminal
CYC	Cyclase
CYP	Cytochrom P450 Enzym
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Da	Dalton
DH	Dehydratase
DMA	Dimethylallyl
DMAPP	Dimethylallyl-Pyrophosphat
DMATS	Dimethylallyltryptophansynthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSP	Dimethylallyl-Thioldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxy ribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Eppstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm (<i>extracted ion chromatogram</i>)
ER	Enoylreduktase
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETK	Elektronentransportkette
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAS	Fettsäuresynthase (<i>fatty acid synthase</i>)
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
h	Stunden (<i>hours</i>)
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HR	Homologe Rekombination

HR-PKS	Hoch-reduzierende Polyketidsynthase
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
KBE	Koloniebildende Einheit
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KR	Ketoreduktase
LPS	Lipopolysaccharid
mFAS	Säugetier Fettsäuresynthase (<i>mammalian fatty acid synthase</i>)
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NHEJ	nicht-homologe Endverknüpfung (<i>non-homologous end joining</i>)
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NR-PKS	Nicht-reduzierende Polyketidsynthase
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDA	Kartoffel-Dextrose-Agar (<i>potato dextrose agar</i>)
PDB	Kartoffel-Dextrose Flüssigmedium (<i>potato dextrose broth</i>)
PPP	Pentosephosphatweg (<i>pentose phosphate pathway</i>)
PR-PKS	Partiell-reduzierende Polyketidsynthase
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
s	Sekunden
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Rasterelektronenmikroskop (<i>scanning electron microscope</i>)
TAE	TRIS-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TCA	Tricarbonsäure (<i>tricarboxylic acid</i>)
TE	Thioesterase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
UTR	Untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid

Zusammenfassung

Naturstoffe, die aus dem Sekundärmetabolismus stammen werden von Organismen nicht unbedingt zum Überleben, der Reproduktion oder der Differenzierung benötigt, bieten aber dennoch einen signifikanten Selektionsvorteil in der Konkurrenz mit anderen Lebewesen. Daraus resultiert, dass viele dieser Naturstoffe in Organismen bestimmte biologische Aktivitäten aufweisen. Durch die biologische Aktivität vieler dieser Substanzen ist beispielsweise der pilzliche Sekundärmetabolismus eine attraktive Quelle für die Entdeckung und Entwicklung neuer Arzneimittel. Bisher wurde nur ein Bruchteil aller existierenden Pilze identifiziert, was bedeutet, dass noch immer ein enormes ungenutztes Potenzial für die Herstellung pharmazeutisch nutzbarer Naturstoffe vorhanden ist. Dieses Potenzial kann durch verschiedene bioinformatische, molekularbiologische und biochemische Ansätze zugänglich gemacht werden.

Die Entdeckung biosynthetischer Gene für Sekundärmetabolite in Pilzen wird dadurch erleichtert, dass relevante Gene für die Herstellung einer Verbindung nebeneinander an einem bestimmten Locus auf dem Chromosom vorliegen, d.h. sie sind geclustert. Diese biosynthetischen Gencluster (BGCs) enthalten ein oder mehrere Gene, deren Proteinprodukte für die Bildung des Kohlenstoffrückgrats des jeweiligen Stoffs verantwortlich ist. Dieses Rückgrat wird durch weitere, im Cluster kodierte, modifizierende Enzyme strukturell diversifiziert. In dieser Arbeit wurden die BGCs für zwei unterschiedliche Naturstoffe und ihre Analoga in dem Ascomyceten *Aspergillus ruber* identifiziert und bestätigt. Außerdem wurden einzelne Schritte in diesen Stoffwechselwegen näher untersucht.

Das Salicylaldehydderivat Flavoglucin und seine Analoga unterscheiden sich nur in der Anzahl und Position der Doppelbindungen in der Heptyl-Seitenkette. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass einige dieser Substanzen biologisch aktiv sind, indem sie beispielsweise als Antioxidantien wirken, antiinflammatorische Effekte vorweisen oder auch an humane Opioid- und Cannabinoidrezeptoren binden. Obwohl Flavoglucin und seine Analoga schon 1934 zum ersten Mal beschrieben wurden, war bis zur Veröffentlichung der in dieser Arbeit beschriebenen Daten nicht viel mehr über ihre Biosynthese bekannt, als dass sie Produkte des Polyketidstoffwechsels sind. Durch Genome Mining konnte in dieser Arbeit ein Gencluster (*fog*-Cluster) im Genom von *A. ruber* identifiziert werden, der alle nötigen Gene für die Biosynthese dieser Stoffe enthält. Die heterologe Expression dieses BGC im Modellorganismus *Aspergillus nidulans* bestätigte, dass der *fog*-Cluster für die Bildung von Flavoglucin und seinen Analoga verantwortlich ist. Gendelektionen in dem heterologen Expressionsstamm, die Überexpression des Gens für die hoch-reduzierende Polyketidsynthase (HR-PKS) *fogA* in *A. nidulans*, *in vitro*-Enzymassays mit der Prenyltransferase FogH und Fütterungsexperimente zur Untersuchung der FAD-abhängigen Oxidoreduktase FogF zeigten einen ungewöhnlichen Weg hin zum finalen Aldehydprodukt. Das Polyketidgrundgerüst wird von FogA in Kooperation mit dem Cupin FogC und den kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen FogB und FogD reduktiv als Salicylalkohol entlassen, nur um nach der C3-Hydroxylierung durch das Cytochrom P450 (CYP) FogE und die C5-Prenylierung durch FogH von FogF wieder zu einem Aldehyd oxidiert zu werden. Diese Reoxidation ist bemerkenswert,

da die Freisetzung des Produkts von einer HR-PKS für gewöhnlich hydrolytisch als Carbonsäure oder reduktiv allerhöchstens als Aldehyd erfolgt. Die Modifikation der Intermediate vor der Reoxidation erfordert scheinbar die Hydroxymethylgruppe des Salicylalkohols, denn eine Prenylierung des synthetisierten Aldehyd-Substratanalogs durch FogH findet nicht statt. Diese Arbeit wurde in Kooperation mit Frau Dr. Huomiao Ran durchgeführt. Die Biosynthese von Flavoglucin weist einige Parallelen zu denen von Sordarial in *Neurospora crassa* und Trichoxid in *Trichoderma virens* auf, unterscheidet sich aber neben der Prenylierung signifikant durch die finale Reoxidation und die Variabilität des Sättigungsmusters in der Heptyl-Seitenkette.

In dieser Arbeit wurde auch die Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie näher untersucht. Aus einer vorigen Studie war bekannt, dass zwei Prenyltransferasen EchPT1 und EchPT2 jeweils die reverse C2-Prenylierung und mehrere konsekutive reguläre Prenylierungen des Indolrings des zyklischen Dipeptids aus L-Tryptophan und L-Alanin katalysieren. Die Einführung einer oder zwei *exo*-Doppelbindungen an den Substituenten um den 2,5-Diketopiperazinring durch eine CYP aus dem identifizierten BGC wurde jedoch nur vermutet. Durch heterologe Expression des postulierten *ech*-BGCs in *A. nidulans* konnte diesem Cluster die Bildung von Substanzen der Echinulin-Familie eindeutig zugewiesen werden. Dabei wurden allerdings nur Substanzen ohne Doppelbindung (Echinulin-Serie) und mit einer (Δ^{10}) Doppelbindung am Tryptophansubstituenten (Neoechinulin A-Serie) gebildet. Das Enzym für die Einführung der zweiten (Δ^{14}) Doppelbindung am Alaninsubstituenten (Neoechinulin B-Serie) scheint nicht durch die Gene des Clusters kodiert zu werden. Auch die Erweiterung des exprimierten BGCs um drei weitere potenzielle Oxidoreduktasen stromabwärts des *ech*-Clusters resultierte nicht in der Produktion von Substanzen mit beiden Doppelbindungen. Fütterungsexperimente bestätigten die Einführung der Δ^{10} -Doppelbindung durch die im *ech*-Cluster kodierte CYP EchP450, aber widerlegten die Hypothese, dass EchP450 auch die Bildung der Δ^{14} -Doppelbindung katalysiert. Weitere *in vitro*-Enzymassays mit der Prenyltransferase EchPT2 zeigten deutlich ihre Präferenz gegenüber Substraten ohne *exo*-Doppelbindung, was in gewissem Maße zur Erklärung der Verhältnisse zwischen den verschiedenen Substanzen der Echinulin-Familie in *A. ruber* beiträgt.

Summary

Natural products which arise from an organism's secondary metabolism are not necessarily required for survival, reproduction and differentiation but offer a significant selective advantage in their respective environment. As a result, many of these natural products display significant biological activities in organisms. Due to the biological activity of many of these substances, the fungal secondary metabolism for example is an attractive source for the discovery and development of new drugs. So far, only a limited number of all existing fungi has been identified, which means that there is still an enormous unused potential for the production of pharmaceutically relevant natural products. This potential can be accessed through various bioinformatic, molecular biological and biochemical approaches.

The discovery of biosynthetic genes for secondary metabolites in fungi is facilitated by the fact that relevant genes for the production of a given compound are located in close proximity to each other on the chromosome, i.e., they are clustered. These biosynthetic gene clusters (BGCs) contain one or more genes whose protein products are responsible for the formation of the carbon backbone of the respective substance. This backbone is structurally diversified by tailoring enzymes encoded by other genes in the cluster. In this thesis, BGCs for two different natural products and their congeners from the ascomycete *Aspergillus ruber* were identified and confirmed. In addition, individual steps in these metabolic pathways were examined in more detail.

The prenylated salicylaldehyde derivative flavoglaucin and its congeners differ from each other only in the number and position of the double bonds of the heptyl side chain. Previous studies have shown that some of these substances are biologically active, for example by acting as antioxidants, showing anti-inflammatory effects, or binding to human opioid and cannabinoid receptors. Although flavoglaucin and its congeners have been known since 1934, not much was known about their biosynthesis other than that they are products of polyketide metabolism. This thesis describes the discovery of a gene cluster (*fog* cluster) in the genome of *A. ruber* through genome mining, which contains all the genes necessary for the biosynthesis of these substances. Heterologous expression of this BGC in the model ascomycete *Aspergillus nidulans* confirmed that the *fog* cluster is responsible for the formation of flavoglaucin and its congeners. Gene deletions in the heterologous expression strain, the overexpression of the gene for the highly reducing polyketide synthase (HR-PKS) FogA in *A. nidulans*, *in vitro* enzyme assays with the prenyltransferase FogH and feeding experiments to investigate the FAD-dependent oxidoreductase FogF showed an unusual route to the final aldehyde product. The polyketide skeleton is reductively released as a salicyl alcohol by FogA in cooperation with the cupin protein FogC and the short-chain dehydrogenases/reductases FogB and FogD, only to be reoxidized to the salicylaldehyde by FogF after C3-hydroxylation by the cytochrome P450 (CYP) FogE and C5-prenylation by FogH. This reoxidation is remarkable, as product release from an HR-PKS usually occurs hydrolytically as a carboxylic acid or reductively as an aldehyde. Modification of the intermediates apparently requires the hydroxymethyl group of the salicyl alcohol, because prenylation of a

synthesized aldehyde substrate analog by FogH does not occur. This work was carried out in cooperation with Dr. Huomiao Ran. The biosynthesis of flavoglaucin shows some parallels to that of sordarial in *Neurospora crassa* and trichoxide in *Trichoderma virens*, but differs significantly in terms of prenylation, the final reoxidation of an alcoholic intermediate to an aldehyde and the variability of the saturation pattern in the heptyl side chain.

Furthermore, the biosynthesis of indole alkaloids of the echinulin family was investigated in more detail. A previous study showed that two prenyltransferases EchPT1 and EchPT2 catalyze the reverse C2 prenylation and several consecutive prenylations at different positions of the indole ring of the cyclic dipeptide cyclo-L-tryptophan-L-alanine. It was speculated that a CYP encoded in the identified BGC introduces two *exo* double bonds on the substituents of the 2,5-diketopiperazine ring. By heterologous expression of the postulated *ech* BGC in *A. nidulans*, the formation of echinulin family indole alkaloids could be clearly assigned to this cluster. However, only substances without a double bond (echinulin series) and with a (Δ^{10}) double bond on the tryptophan substituent (neoechinulin A series) were formed. The enzyme for the introduction of the second (Δ^{14}) double bond on the alanine substituent (neoechinulin B series) does not seem to be encoded by the genes of the *ech* cluster. The expansion of the expressed BGC by three additional potential candidate genes downstream of the *ech* cluster did not yield the products with both double bonds. Feeding experiments confirmed the introduction of the Δ^{10} double bond by the CYP EchP450 encoded in the *ech* cluster but refuted the hypothesis that EchP450 also catalyzes the formation of the Δ^{14} double bond. Further *in vitro* enzyme assays with the prenyltransferase EchPT2 showed its clear preference for substrates without an *exo* double bond, which contributes to some extent to the explanation of the different product ratios between the various echinulin family alkaloids in *A. ruber*.

1 Einleitung

1.1 Pilze, ihre Naturstoffe und ihre Beziehung zur Menschheit

In der Klassifikation der Lebewesen bilden etwa 2,2 bis 3,8 Millionen pilzliche Spezies ein eigenes Reich innerhalb der Domäne Eukarya. Davon wurden bisher nur etwa 120.000 benannt und beschrieben.¹ Ursprünglich existierten nur zwei Reiche in dieser Domäne: basierend auf der Fähigkeit zur Fortbewegung wurden Organismen entweder in das Reich der Tiere oder der Pflanzen aufgeteilt. Aufgrund ihres immobilen Charakters wurden Pilze den Pflanzen zugeordnet. Im Jahre 1969 publizierte Robert Whittaker den ersten großen Änderungsvorschlag für die von Carl von Linné etablierte binäre Klassifizierung von Lebewesen, indem er argumentierte, die Pilze als ein separates Königreich, getrennt von den klassischen Tieren und Pflanzen, zu betrachten.² Aufgrund unterschiedlicher Charakteristika zwischen Pilzen und Pflanzen wurde die vorherige Einteilung revidiert und schließlich von der wissenschaftlichen Gesellschaft akzeptiert. Pilze sind chemoorganotroph und beziehen Nährstoffe meist über Absorption von extrazellulären, enzymatischen Verdauungsprodukten. Außerdem bestehen ihre Zellwände aus Chitin, während Pflanzen Zellwände aus Zellulose besitzen und Photosynthese betreiben, um Kohlenhydrate zu synthetisieren. Aus ähnlichen Gründen wurden neben Pilzen auch Bakterien, Pflanzen, Protozoa, Tiere und Archaeen alle als separate Domänen bzw. Reiche in der Klassifikation der Lebewesen eingeteilt.

1.1.1 Der Einfluss von Pilzen auf den Menschen

Pilze haben seit jeher einen sehr ambivalenten Einfluss auf das menschliche Leben (Abbildung 1). Auf der einen Seite stehen die negativen Auswirkungen, die durch Pilze hervorgerufen werden, wie zum Beispiel der Verderb von Lebensmitteln, der hauptsächlich Hefen oder Schimmelpilzen wie *Aspergillus* und *Penicillium* zuzuschreiben ist.³ Durch ihre saprotrophe Lebensweise sind Pilze außerdem die Hauptursache für die Zersetzung von Holz und verursachen jedes Jahr Schäden in Milliardenhöhe.⁴ Einer der verheerendsten Effekte auf den Menschen haben allerdings pflanzenpathogene Pilze. Durch sie hervorgerufene Infektionen führten zu historischen Epidemien unter Nutzpflanzen und damit einhergehenden wirtschaftlichen Verlusten.⁵ Die Spanne an pflanzenpathogenen Pilzen ist groß und schließt beispielsweise Ascomycota wie *Fusarium* (Verursacher der Fusariosen), Basidiomyceten wie *Ustilago maydis* (Verursacher des Maisbeulenbrands) oder *Puccinia graminis* (Verursacher von Getreideschwarzrost) mit ein.^{6–8} Lange Zeit wurde auch geglaubt, dass ein Pilz für die große irische Hungersnot von 1845 – 1849 verantwortlich war. Der Verursacher der Kartoffelfäule *Phytophthora infestans* ist allerdings Mitglied der Peronosporomycetes (früher: Oomycetes), die ursprünglich als Pilze klassifiziert, aber aufgrund wichtiger physiologischer und morphologischer Unterschiede als eigene Abteilung etabliert wurden.⁹ Pilze sind nicht ausschließlich pflanzenpathogen, auch Menschen und Tiere können an diversen Pilzinfektionen erkranken. Verschiedene Arten der Aspergillose (chronisch, invasiv, allergisch, etc.) werden hauptsächlich durch den Ascomyceten *Aspergillus fumigatus*

hervorgerufen und töten zusammengenommen ungefähr 600.000, meist immunsupprimierte Menschen pro Jahr.¹⁰ Auch andere Krankheiten wie Lungenentzündung, Candidose oder Dermatophytose können durch Pilze der Gattungen *Pneumocystis*, *Candida* oder verschiedenen Dermatophyten ausgelöst werden.^{11–13}

Trotz aller schädlichen Einflüsse von Pilzen auf den Menschen sind die nützlichen und positiven Aspekte dieser Organismen vielfältig und haben die Entwicklungsgeschichte der Menschheit nachhaltig geprägt. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist dafür ein Paradebeispiel. Sie wird als Triebmittel beim Backen, sowie zur Fermentation in der Wein- und Bierherstellung seit Jahrtausenden verwendet. Archäologen konnten die Produktion von durch Bäckerhefe fermentierte Getränke über 9.000 Jahre und über weite Teile der Welt zurückverfolgen (z.B. China 7.000 v. Chr.; Iran 6.000 v. Chr.; Ägypten 3.000 v. Chr.).^{14,15} Außer *S. cerevisiae* werden auch andere Pilze für die Fermentation von Nahrungsmitteln benutzt. Sojasauce wird, wie auch Miso, aus der Fermentation von Sojabohnen und Getreide mit Schimmelpilzen wie *Aspergillus oryzae* gewonnen und stellt ein wichtiges, durch Pilze fermentiertes Lebensmittel mit Ursprung im asiatischen Raum dar.^{16,17} Der Schimmelpilz *Penicillium roqueforti* trägt zur blauen Farbe und der Geschmacksentwicklung in Blauschimmelkäsen wie Roquefort und Stilton bei, ebenso wie *Penicillium camemberti* für die Herstellung von Camembert, Brie und anderen Weichkäsen verwendet wird.^{18,19} Außer für die Produktion von Nahrungsmitteln dienen bekanntermaßen die Fruchtkörper von Speisepilzen selbst dem Verzehr. Pilzliche Fermentation wird auch in anderer Form nutzbar gemacht. Entweder wirken Pilze in direkten Fermentationsprozessen auf Material ein (z.B. zur Prozessierung von Holzstoff zur Papierherstellung oder der Bioremediation industrieller Abfälle) oder sie dienen als Quelle für Enzyme mit zahlreichen industriellen Anwendungen.^{20–22}

Darüber hinaus können Pilze auch zur Färbung von Textilien benutzt werden und spielen in der Wissenschaft als gut erforschte, eukaryotische Modellorganismen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*) schon lange eine große Rolle.^{23–25} Verschiedene entomopathogene Pilze werden auch zur Bekämpfung von Schädlingen eingesetzt.²⁶

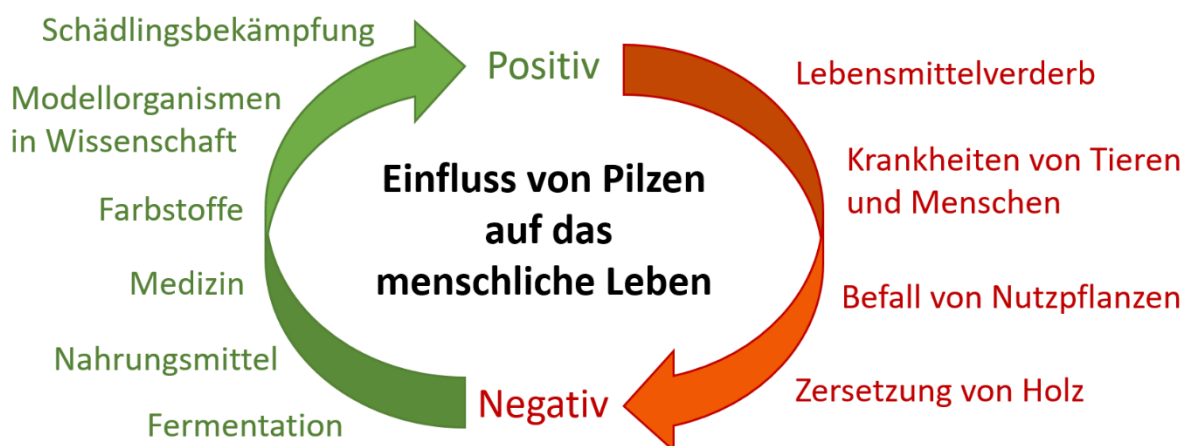


Abbildung 1: Positive und negative Aspekte der Beziehung zwischen Pilzen und Menschen

1.1.2 Pilzliche Naturstoffe und ihre Rolle in der Beziehung zwischen Mensch und Pilz

Einige der erwähnten Beispiele für die besondere Beziehung zwischen Pilz und Mensch sind auf von Pilzen gebildete Metabolite zurückzuführen. Die Bäckerhefe beispielsweise wandelt bei der Gärung Glukose in Ethanol und Kohlenstoffdioxid um, die den Produkten erst die gewünschten Eigenschaften verleihen (d.h. Alkohol in Wein, Gas als Backtriebmittel). Produkte des Sekundärstoffwechsels mancher pathogener Pilze (hauptsächlich Melanine und Siderophore) spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Infektion von Pflanzen oder Menschen.²⁷ Viele pilzliche Naturstoffe haben aufgrund ihrer biologischen Aktivität aber vor allem in der Medizin als Arzneimittel oder als Mykotoxin einen hohen Stellenwert.

Die Entdeckung des β -Lactam Antibiotikums Penicillin (Abbildung 2A) aus dem Pilz *Penicillium chrysogenum* (jetzt: *P. rubens*) durch Alexander Fleming im Jahre 1928 revolutionierte die Medizin und ebnete den Weg für die Entdeckung und Entwicklung einer Vielzahl antibiotischer Substanzen, die bis heute zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten eingesetzt werden.²⁸ Das von *Penicillium griseofulvum* produzierte Antimykotikum Griseofulvin (Abbildung 2A) wird auch gegenwärtig noch für die Behandlung von Dermatophytosen verwendet.²⁹ Die in *Aspergillus terreus* entdeckten Statine (z.B. Lovastatin; Abbildung 2A) sind für ihre cholesterinsenkende Wirkung bekannt und werden auch heutzutage noch verabreicht.³⁰ Im Jahre 2016 betrug der Anteil pilzlicher Substanzen aller von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Naturprodukte, etwa 23 % (47 % aus Pflanzen, 30 % aus Bakterien). Rein antibiotisch wirksame Substanzen stammten dabei sogar zu etwa 46 % aus Pilzen (51 % aus Bakterien, 3 % aus Pflanzen).³¹

Die im Vergleich zu den zuvor genannten Substanzen meist schädlichen Mykotoxine sind niedermolekulare (< 700 Da) Sekundärmetabolite, die von verschiedenen Pilzgattungen produziert werden, allen voran von den Ascomyceten *Penicillium*, *Aspergillus* und *Fusarium*.³² Die verantwortlichen Pilze verursachen das Verderben von Nahrungsmitteln und mit ihrem Verzehr einhergehende Vergiftung von Menschen oder Tieren. In den Bereichen Gesundheit von Mensch und Tier und aufgrund verdorbener landwirtschaftlicher Produkte verursachen diese Substanzen jährlich Schäden in Millionenhöhe.³³ Die Kontamination von Nahrungsmitteln oder landwirtschaftlichen Produkten hängt von Lagerungs-, Umwelt- oder ökologischen Bedingungen ab und liegt oft außerhalb menschlicher Kontrolle. Während die weltweite Kontamination von Nahrungspflanzen früher auf etwa 25 % geschätzt wurde, wird heute angenommen, dass ca. 60 – 80 % mit einer gewissen Menge an Mykotoxinen kontaminiert sind.³⁴

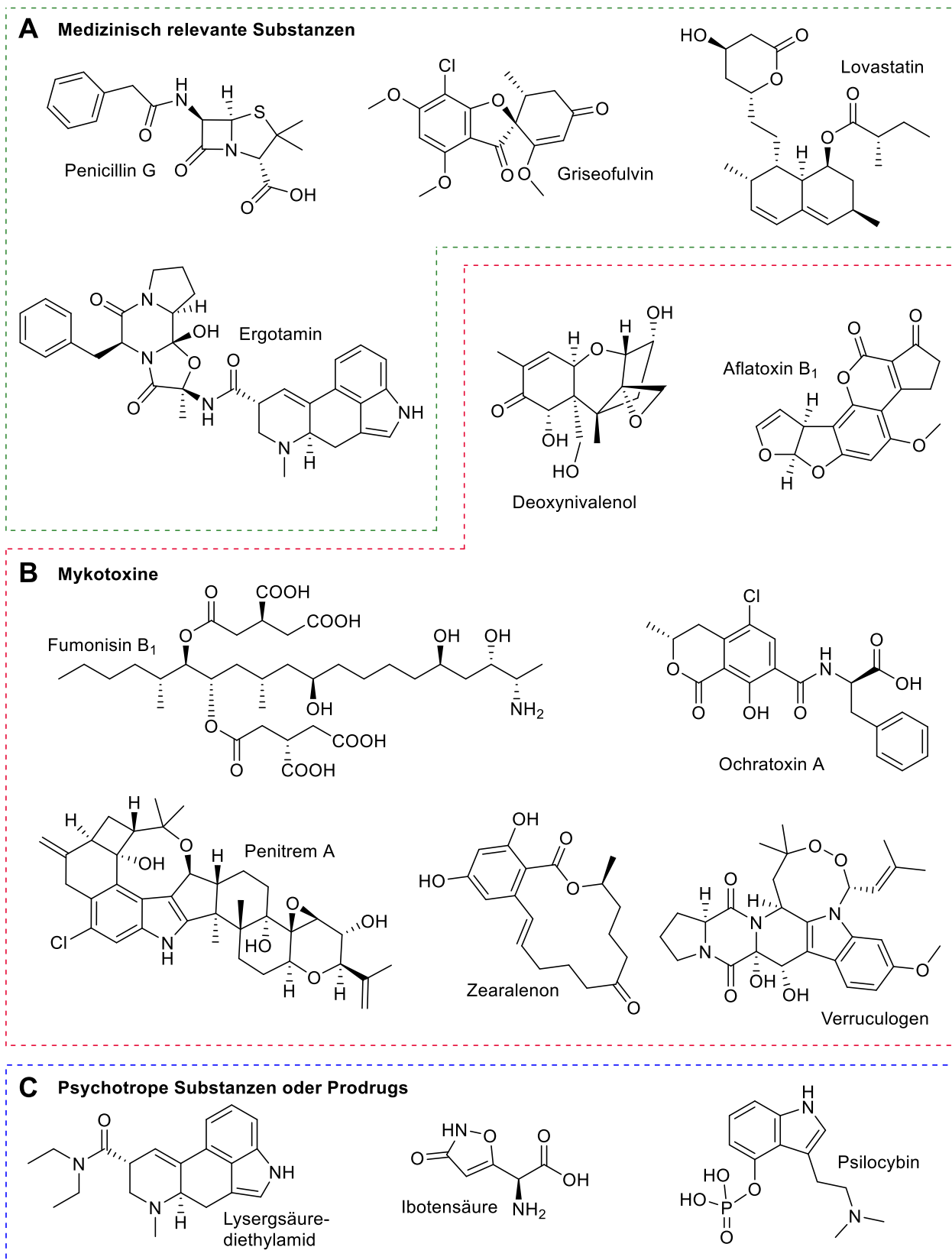


Abbildung 2: Beispiele für pilzliche Naturstoffe oder Derivate mit Einfluss auf den Menschen

Beispiele für Substanzen aus Pilzen oder davon abgeleitete Derivate mit medizinischer Relevanz (A), Wirkung als Mykotoxin (B) oder psychotropen Eigenschaften (C).

Die aus der gesundheitlichen und agronomischen Perspektive gesehenen signifikantesten Mykotoxine sind die Aflatoxine, die Fumonisine, die Trichothecene, Ochratoxin A, Zearalenon, tremorgene Toxine und die Ergotalkaloide.³⁵ Aflatoxine sind Difuranocoumarinderivate, unter denen Aflatoxin B₁ (Abbildung 2B) das am häufigsten vorkommende, toxischste und krebserregendste ist.³⁶ Aflatoxine werden vor allem von *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* produziert, wurden aber auch in anderen *Aspergillus* spp. entdeckt.^{37,38} Im Menschen wirken sie hepatokarzinogen und sind geno-, wie auch immunotoxisch.^{39,40} Fumonisine (z.B. Fumonisin B₁; Abbildung 2B) sind Polyketidderivate, die hauptsächlich von *Fusarium verticillioides* und *Fusarium proliferatum*, Pathogenen von Mais und Sorghumhirse, gebildet werden.⁴¹ Aufgrund ihres Aufbaus ähneln sie Sphingosin, einem essenziellen Phospholipid in Zellmembranen. Es wird angenommen, dass die Toxizität der Fumonisine durch Konkurrenz mit Sphingosin im Sphingolipidstoffwechsel verursacht wird.⁴² Trichothecene sind eine Familie von über 200 Sesquiterpenderivaten mit einer gemeinsamen trizyklischen 12,13-Epoxytrichothec-9-en Kernstruktur (z.B. Deoxynivalenol; Abbildung 2B), die generell als Inhibitoren der eukaryotischen Proteinbiosynthese fungieren.⁴³ Trichothecen-produzierende Gattungen umfassen *Fusarium*, *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichoderma* und *Trichothecium*.⁴⁴ Ochratoxin A (Abbildung 2B) weist aufgrund seines Isocoumarinkerns strukturelle Ähnlichkeiten zu Aflatoxinen auf, allerdings ist das Isocoumarin hier über ein Amid mit L-Phenylalanin verbunden. Ochratoxin A wurde 1965 zuerst aus *Aspergillus ochraceus* isoliert, wird aber von einer Vielzahl von weiteren *Aspergillus* spp. produziert.⁴⁵ Ochratoxin A wurde nicht nur als akutes Nephrotoxin identifiziert, sondern zeigt auch hepatotoxisches, immunsuppressives, teratogenes und krebserzeugendes Verhalten.⁴⁶ Zearalenon (Abbildung 2B) wird von verschiedenen *Fusarium* spp., hauptsächlich aber von *F. graminearum* hergestellt und zeigt an sich keine akute Toxizität. Aufgrund seiner sehr ähnlichen Struktur zu 17 β -Estradiol wurde ihm allerdings eine östrogene Wirkung nachgewiesen.⁴⁷ Tremorgene Mykotoxine sind meistens Indolderivate wie die Indol-Diterpene der Lolitrem-Familie (z.B. Lolitrem B), die Penitreme (z.B. Penitrem A; Abbildung 2B) oder auch indolhaltige zyklische Dipeptide wie die Fumitremorgine oder Verruculogen (Abbildung 2B). Während Lolitreime ausschließlich von *Epichloë* spp. hergestellt werden, können Penitreme, Fumitremorgine und Verruculogen von verschiedenen *Aspergillus* oder *Penicillium* spp. produziert werden. Wie die Bezeichnung schon vermuten lässt, induzieren diese Substanzen nach dem Verzehr in vielen Säugetieren Tremore.⁴⁸

Die stickstoffhaltigen Indolderivate der Ergotalkaloide (z.B. Ergotamin; Abbildung 2A) werden hauptsächlich vom Mutterkornpilz *Claviceps purpurea* produziert. *Aspergillus fumigatus* oder *Penicillium camemberti* sind allerdings auch in der Lage, Substanzen dieser Familie zu synthetisieren.^{49,50} *Claviceps purpurea* infiziert vorwiegend die Samen von Roggen und Triticale, aber auch von Weizen und anderen Getreiden und bildet dabei Sklerotien, das sogenannte Mutterkorn, aus. Ergotalkaloide waren für historische Episoden von Massenvergiftungen im Mittelalter verantwortlich. Zu historischen Ereignissen im Zusammenhang mit Mutterkornvergiftungen zählen der erste Kreuzzug im Jahre 1095, diverse Hexenprozesse (vor allem in Salem in den 1690ern) und der unterbrochene russische Feldzug 1722 unter Peter dem Großen gegen das Osmanische Reich.⁵¹ Eine Vergiftung mit Ergotalkaloiden kann zum Ergotismus führen, der hauptsächlich durch Symptome wie Tremore bzw. Muskelkrämpfe, Diarrhö, Psychosen, Erbrechen und Vasokonstriktionen gekennzeichnet ist.^{33,52}

Ergotalkaloide haben allerdings nicht nur einen schlechten Einfluss auf das menschliche Leben: Aufgrund der vasokonstriktiven Eigenschaften werden manche Ergotalkaloide (z.B. Ergometrin oder sein halbsynthetisches Derivat Methylergometrin) als Medikament zur Behandlung von Blutungen nach der Geburt eingesetzt.⁵³ Außerdem fanden Ergotamin und sein Derivat Dihydroergotamin Anwendung zur Akuttherapie bei Migräne, während ein halbsynthetisches Derivat von Ergokryptin, das 2-Bromergokryptin zur Behandlung von Parkinson dient.^{54,55}

Pilzliche Naturstoffe oder ihre Derivate waren und sind auch von sozialer bzw. religiöser Relevanz. Das halbsynthetische Alkaloid Lysergsäurediethylamid (LSD; Abbildung 2C) unterscheidet sich nur durch den Diethylamidsubstituenten von der Lysergsäure aus dem Ergotalkaloidstoffwechsel und ist eines der stärksten bekannten Halluzinogene. Aufgrund der psychotropen Effekte von Muscinol und Ibotensäure (Abbildung 2C) im Fliegenpilz (*Amanita muscaria*) oder des Prodrugs Psylocibin (Abbildung 2C) in psylocibinhaltigen Pilzen („magic mushrooms“; *Psilocybe* spp. und andere) wurden diese als Entheogene in verschiedenen religiösen oder nichtreligiösen Zusammenhängen konsumiert.^{56–58}

1.2 Ascomyceten

Besonders die Ascomyceten prägten die Beziehung zum Menschen nachhaltig. Innerhalb der Pilze stellen die Ascomyceten (Schlauchpilze) mit über 64.000 bekannten Arten die größte Abteilung dar und bilden zusammen mit den Basidiomycota das Unterreich Dikarya.⁵⁹ Die Abteilung der Ascomyceten lässt sich wiederum in drei Unterabteilungen einteilen.⁶⁰ Die Pezizomycotina (echte Schlauchpilze) gruppiert Ascomyceten, die sich eher durch Fission als durch Ausknospung vermehren und enthält fast alle Schlauchpilze, deren Fruchtkörper mit dem bloßen Auge nicht sichtbar sind. Die Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* sind wichtige Mitglieder dieser Unterabteilung. Die Saccharomycetales sind die einzige Ordnung in der Unterabteilung der Saccharomycotina (echte Hefen). Mitglieder der Saccharomycotina vermehren sich durch Ausknospung und bilden dabei kein Ascokarp (Fruchtkörper).⁶¹ Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein bekannter Vertreter dieser Unterabteilung. Die Taphrinomycotina sind nur durch genetische Merkmale zusammenzufassen und viele ihrer Mitglieder leben parasitisch. Der Erreger einer interstitiellen Lungenentzündung *Pneumocystis jirovecii* ist neben dem bekannten Modellorganismus *Schizosaccharomyces pombe* einer der bekanntesten Mitglieder in dieser Unterabteilung.^{11,62}

Ascomyceten können als einzellige Hefen wachsen und sich wie oben erwähnt durch Ausknospung (z.B. *S. cerevisiae*; Saccharomycotina) oder durch Fission (z.B. *Schizosaccharomyces pombe*; Taphrinomycotina) vermehren. Der Großteil der Ascomyceten, so auch die Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* (Pezizomycotina), bilden allerdings einen Thallus aus eng verflochtenen, septierten Hyphen, deren Querwände von einem einfachen Porus durchbrochen sind. Diese Struktur wird als das Mycel bezeichnet. Ascomycota sind in der Lage sich sowohl in ungeschlechtlicher (anamorph), als auch in geschlechtlicher Form (teleomorph) fortzupflanzen.⁶² Die geschlechtliche Form bildet bei der Vermehrung Ascomata (Fruchtkörper; singular: Ascoma, auch Ascokarp) in denen in spezialisierten, schlauchähnlichen Strukturen (Asci) die Ascosporen gebildet werden. Durch diese Asci erhielten die Ascomyceten ihren Namen. Die bei den unterschiedlichen Arten der Vermehrung eingenommenen

Formen des gleichen Pilzes unterscheiden sich morphologisch zumeist stark, sodass erst molekular-genetische Untersuchungen dazu führten, dass früher als separat betrachtete Arten unzweifelhaft einer Spezies zugeordnet werden konnten. Das führte zur Konstruktion einer künstlichen Gruppe, den Fungi imperfecti (alternativ: Deuteromycetes), deren Mitglieder aufgrund ihrer noch unbekannten teleomorphen Form dieser Gruppe angehören.

1.3 Die Gattung *Aspergillus*

Neben der Nutzung wichtiger Fermentationsprozesse, speziell durch die Bäckerhefe, produzieren zum Beispiel die Gattungen *Aspergillus* oder *Penicillium* einflussreiche Naturstoffe wie Mykotoxine, Antibiotika, Statine etc. In dieser Arbeit spielt die Gattung *Aspergillus* eine übergeordnete Rolle und soll daher näher beschrieben werden.

Innerhalb der Pezizomycotina ist die Gattung *Aspergillus* taxonomisch der Familie der Aspergillaceae in der Ordnung Eurotiales und der Klasse der Eurotiomycetes zu verorten.⁶³ Die Gattung *Aspergillus* teilt sich wiederum in sechs Subgattungen (*Circumdati*, *Nidulantes*, *Fumigati*, *Aspergillus*, *Cremeri* und *Polypaecilum*) auf, die basierend auf ihrer Morphologie und Physiologie weiterhin in 27 Sektionen unterteilt werden. Der Name „*Aspergillus*“ stammt von den aspergillähnlichen Konidienträgern, aus denen bei der Fruktifikation Konidiosporen ausreifen. Dieses morphologische Element ist typisch für die Gattung *Aspergillus*. Bei der ungeschlechtlichen Vermehrung der anamorphen Form wächst als Verzweigung orthogonal zu Längsachse einer Hyphenzelle ein Konidiophor und bildet damit eine Fußzelle. Im weiteren Verlauf verdickt sich der Konidiophor terminal und bildet einen kugel- bis keulenförmigen Vesikel. An der Oberfläche der Vesikel stülpen sich entweder Metulae aus oder es wachsen direkt kegelförmige Phialiden, in denen durch Karyokinese mehrere Zellkerne entstehen, die anschließend in den konidienproduzierenden terminalen Teil der Phialiden bzw. Sekundärphialiden verteilt und als aneinanderhängende Ketten von Konidien abgeschnürt werden (Abbildung 3).

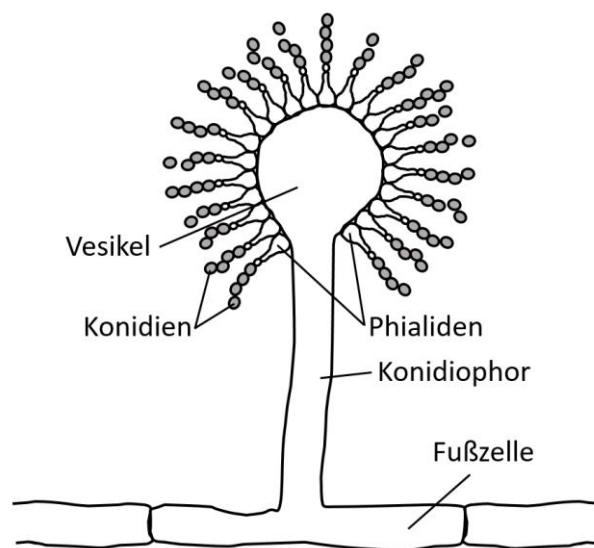


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines namensgebenden *Aspergillus*-Konidiosporenträgers

1.4 *Aspergillus ruber* und seine Sekundärmetabolite

Aspergillus ruber, auch bekannt unter dem Namen seines Teleomorphs *Eurotium rubrum*, wurde im Jahr 1901 zum ersten Mal beschrieben.⁶⁴ Die Speziesbezeichnung „*ruber*“ (lat. rot) kommt durch die charakteristische rot-orange Färbung der Hyphen nach längerer Wachstumsdauer zustande, was bei der Kultivierung auf Festmedien im Labor gut beobachtet werden kann. Dabei tritt die Rotfärbung im Zentrum der Kolonie am intensivsten auf und geht zum Rand ins gelbliche über (Abbildung 4). Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal von *A. ruber* gegenüber verwandter Spezies ist die Form und Größe der Ascosporen. Ihr Durchmesser über- oder unterschreitet selten 5,0 – 6,0 µm und sie besitzen eine distinkte Längsfurche mit niedrigen angerauten Graten (Abbildung 4G).³

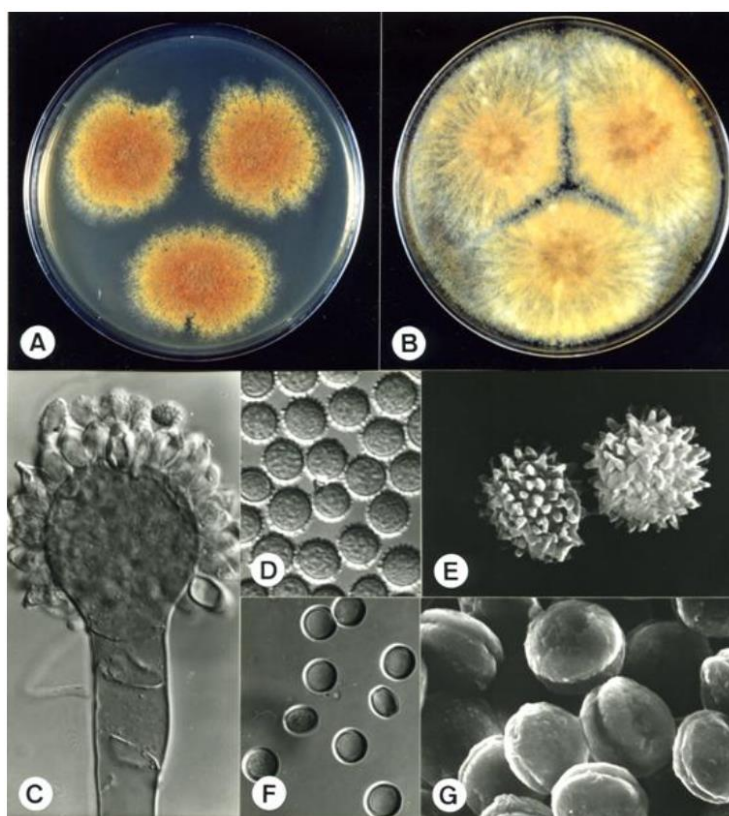


Abbildung 4: Morphologie von *A. ruber*

Kolonien auf MEA nach 14 Tagen bei 25°C (A), Kolonien auf C20S nach 14 Tagen bei 25°C (B), Konidienträger (x1200) (C), Konidien (x2350) (D), Konidien (SEM, x13710) (E), Ascosporen (x1240) (F), Ascosporen (SEM, x8960) (G). Bild bezogen von https://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802030009 am 17.03.2021.

Aspergillus ruber ist generell ein xerophiler Organismus, der global eine breite Spanne an Lebensräumen besiedelt, aber bevorzugt in wärmeren Regionen vorkommt.³ Verschiedene Stämme von *A. ruber* wurden hauptsächlich aus salzreichen Habitaten wie dem toten Meer, Mangrovenwäldern, Korallenriffen oder Meeresbodensediment isoliert, ließen sich allerdings auch auf Nahrungsmitteln wie Nüssen, Bohnen, Reis oder Maiskörnern finden.^{65–71} Auch *Aspergillus ruber* wird in der asiatischen Küche für diverse Fermentationsprozesse eingesetzt. Neben *A. repens* und andern *Aspergillus* spp. wird *A. ruber* in Starterkulturen für die Fermentation von Bonito (*Katsuwonus pelamis*) zu

Katsuobushi eingesetzt.⁷² Außerdem wurde *A. ruber* als eine von 25 isolierten *Aspergillus* spp. in fermentierendem Meju gefunden.⁷³

A. ruber produziert hauptsächlich drei Typen von Sekundärmetaboliten: Echinulin-, Flavoglaucin- und Anthrachinonderivate.⁷⁴ Substanzen der Echinulin-Familie und darauf basierte Derivate sind Indolalkaloide mit einem 2,5-Diketopiperazinkern. Flavoglaucin und seine Analoga sind prenylierte und hydroxylierte 2-Alkyl-Salicylaldehydderivate. Diese beiden Typen werden in den Kapiteln 1.4.1 und 1.4.2 noch näher beschrieben (Abbildung 6 und Abbildung 7). Von Emodin abgeleitete Anthrachinonderivate wie Catenarin oder Rubrocristin tragen durch ihre meist gelbe, orange oder rote Färbung zum Phänotyp von *A. ruber* bei.^{75,76} Außer diesen drei Haupttypen konnten auch noch verschiedene Steroide (z.B. 3 β ,5 α -Dihydroxy-10 α -Methyl-6 β -Acetoxyergosta-7,22-dien), schwefelhaltige Benzofurane (z.B. Eurothiocin A), Benzofuranonderivate (z.B. Europhenol A), Zinniol, Butyrolacton I und Epiheveadrid aus *A. ruber* isoliert werden (Abbildung 5).^{71,77–79} Dieses Sekundärmetabolitprofil scheint typisch für viele *Eurotium* spp. zu sein, wobei *E. rubrum* und *E. cristatum* (anamorph: *A. cristatus*) jedoch die höchste Diversität in Bezug auf die produzierten Hydroxyxanthrachinone aufweisen.⁸⁰

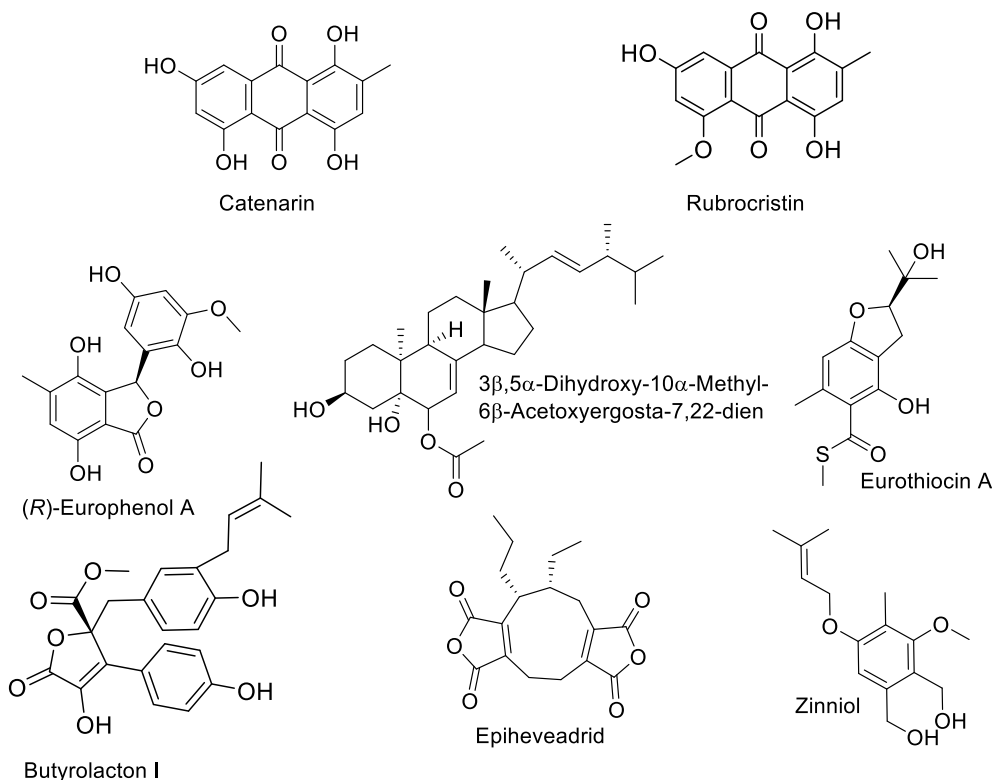


Abbildung 5: Strukturen diverser Sekundärmetabolite aus *A. ruber*

Mit Ausnahme von *A. clavatus*, *A. rambellii* und *A. cristatus* ist das Genom von *A. ruber* mit 26,2 Mbp kleiner als die Genome anderer sequenzierter *Aspergillus* spp.⁸¹ Nach einfacher Analyse mit dem Biosynthesegencluster (BGC)-Detektionstool AntiSMASH 5.0 enthält das Genom des bisher einzigen sequenzierten Stamms, *A. ruber* CBS135680, 36 biosynthetische Gencluster, welche in vier NRPS-, acht NRPS-ähnliche-, acht PKS-, zehn Terpen-, vier Hybrid- und zwei Siderophor-Cluster unterteilt werden können.^{66,82} Aus Gründen, die in Kapitel 4.1.2 näher erläutert werden, sollte diese Analyse jedoch

nicht als vollständig und absolut korrekt angesehen werden. Dennoch weist sie darauf hin, dass *A. ruber* ein signifikantes biosynthetisches Potenzial birgt.

1.4.1 Flavoglaucin und Analoga

Im Jahr 1934 wurden von Bernard S. Gould und Harold Raistrick aus verschiedenen Spezies der *A. glaucus*-Gruppe ein gelbes und ein oranges Pigment isoliert.⁸³ Dem gelben Pigment wurde dabei der Name Flavoglaucin gegeben, während das orange Pigment als Auroglaucin bezeichnet wurde. Die Autoren hielten diese Stoffe für charakteristische Produkte der *A. glaucus*-Gruppe. Nachdem Flavoglaucin und Auroglaucin im Jahr 1943 allerdings auch aus *A. echinulatus* isoliert wurde, musste diese Annahme revidiert werden.⁸⁴ Erst in 1953 wurde die Struktur von Flavoglaucin korrekt als 2-Heptyl-3,6-Dihydroxy-5-(3''-Methylbut-2''-enyl)-Benzylaldehyd aufgeklärt, nachdem in vorherigen Studien die Präsenz des Aldehyds nicht erkannt und an seiner Stelle fälschlicherweise eine Methylgruppe vermutet wurde.^{85–89} Analog dazu wurde Auroglaucin als 2-(1'*E*,3'*E*,5'*E*)-1',3',5'-Heptatrien-1-yl-3,6-Dihydroxy-5-(3''-Methylbut-2''-enyl)-Benzylaldehyd identifiziert. Flavoglaucin, Auroglaucin und ihre anderen später isolierten Analoga Aspergin, Dihydroauroglaucin, Isoaspergin, das 2-Heptadi-(1'*E*,5'*E*)-en-1-yl-Analog, Isotetrahydroauroglaucin und Isodihydroauroglaucin unterscheiden sich nur durch Anzahl und Position der Doppelbindungen in der C7-Alkyl-Seitenkette (Abbildung 6).^{90–92}

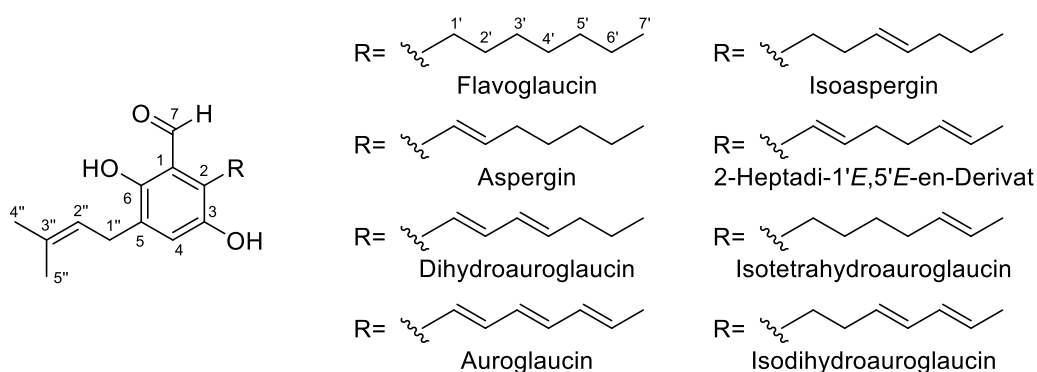


Abbildung 6: Strukturen von Flavoglaucin und seinen Analoga

A. ruber ist Mitglied der *A. glaucus*-Gruppe und basierend auf den Ergebnissen von Raistrick ist es daher nicht überraschend, dass in ihm die genannten Substanzen gefunden wurden.⁹² Außer aus Pilzen der *A. glaucus*-Gruppe wurden einige dieser Substanzen auch aus *Penicillium charlesii* und aus dem Actinobakterium *Streptomyces atrovirens* isoliert.^{93,94} Darüber hinaus konnten diese Stoffe erst kürzlich aus den Pflanzen *Portulaca oleracea*, *Piper wallichii* und *Phlomis tuberosa* extrahiert werden.^{95–97} Ascomyceten adaptierten sich an viele verschiedene Umgebungen, unter anderem können sie auch endophytische Habitate besiedeln.⁹⁸ *Aspergillus* spp. wurden z.B. aus Wurzeln von *Hibiscus tiliaceus*, der Rinde von *Melia azedarach* oder den marinen Algen *Sargassum thunbergii* bzw. *Codium fragile* isoliert, sodass es denkbar ist, dass diese Substanzen eher von endophytischen Pilzen synthetisiert werden, als von den genannten Pflanzen.^{71,92,99,100}

Seitdem 1965 durch Zugabe von [¹⁴C]-markiertem Acetat zu *A. pseudoglaucus*-Kulturen nachgewiesen wurde, dass Flavoglaucinanaloga Produkte des Polyketidstoffwechsels sind, wurde die Biosynthese dieser Substanzen nicht weiter untersucht.¹⁰¹ Nichtsdestotrotz sind Flavoglaucin und seine Analoga aufgrund etlicher biologischer Aktivitäten noch immer Gegenstand aktueller Forschung (Tabelle 1).

Tabelle 1: Biologische Aktivitäten von Flavoglaucin und seinen Analoga

Biologische Aktivität	Referenz
α-Glucosidase-Inhibitor	97
Antibakterielle Aktivität gegen Fischpathogene	93
Antiinflammatorische Effekte gegen LPS-stimulierte Makrophagen	102
Antioxidative Effekte als Radikalfänger gegen DPPH und Superoxid	103
Antitumor Aktivität gegen Tumorbildung von Maushautzellen und EBV-vermittelte Tumore	104
Antivirale Aktivität gegen Herpes Simplex Virus-1	105
Bindeaffinität für humane Opioid- und Cannabinoid-Rezeptoren	106

1.4.2 Indolalkaloide der Echinulin-Familie

Adolfo Quilico und Luigi Panizzi beschrieben 1943 zum ersten Mal einen „weißen Stoff von sterinartigem Aussehen“, der aus *A. echinulatus* isoliert wurde. Der Name dieser Spezies resultierte schließlich in der Benennung des Stoffs als Echinulin.⁸⁴ Die Strukturaufklärung von Echinulin wurde in verschiedenen Studien veröffentlicht, bishin zur Feststellung seiner absoluten Konfiguration (Abbildung 7A).^{107–109}

Aufgrund ihrer gemeinsamen Kernstruktur können viele andere Indolalkaloide der Echinulin-Familie zugeordnet werden. Indoldiketopiperazine der Echinulin-Familie besitzen alle ein gemeinsames Rückgrat bestehend aus dem zyklischen Dipeptid der Aminosäuren L-Tryptophan (L-Trp) und L-Alanin (L-Ala) mit einem reversen Prenylrest an C2. Diese Substanzen unterscheiden sich lediglich durch zusätzliche Prenylgruppen und dem Oxidationsstatus der Substituenten am 2,5-Diketopiperazinkern. Abhängig von der Anzahl dieser *exo*-Doppelbindungen, d.h. zwischen C10 und C11 (Δ^{10}) und C14 und C17 (Δ^{14}) können diese Metabolite noch weiter in die Echinulin-Serie ohne Doppelbindung, die Neoechinulin A-Serie mit einer Doppelbindung (Δ^{10}) und die Neoechinulin B-Serie mit zwei Doppelbindungen ($\Delta^{10,14}$) kategorisiert werden (Abbildung 7B). Seit der beschriebenen ersten Isolierung in 1943 konnten Echinulin und seine Analoga in zahlreichen *Aspergillus* und *Penicillium* spp., *Microascus tardifaciens* und scheinbar auch in einigen Pflanzen gefunden werden.^{110,111}

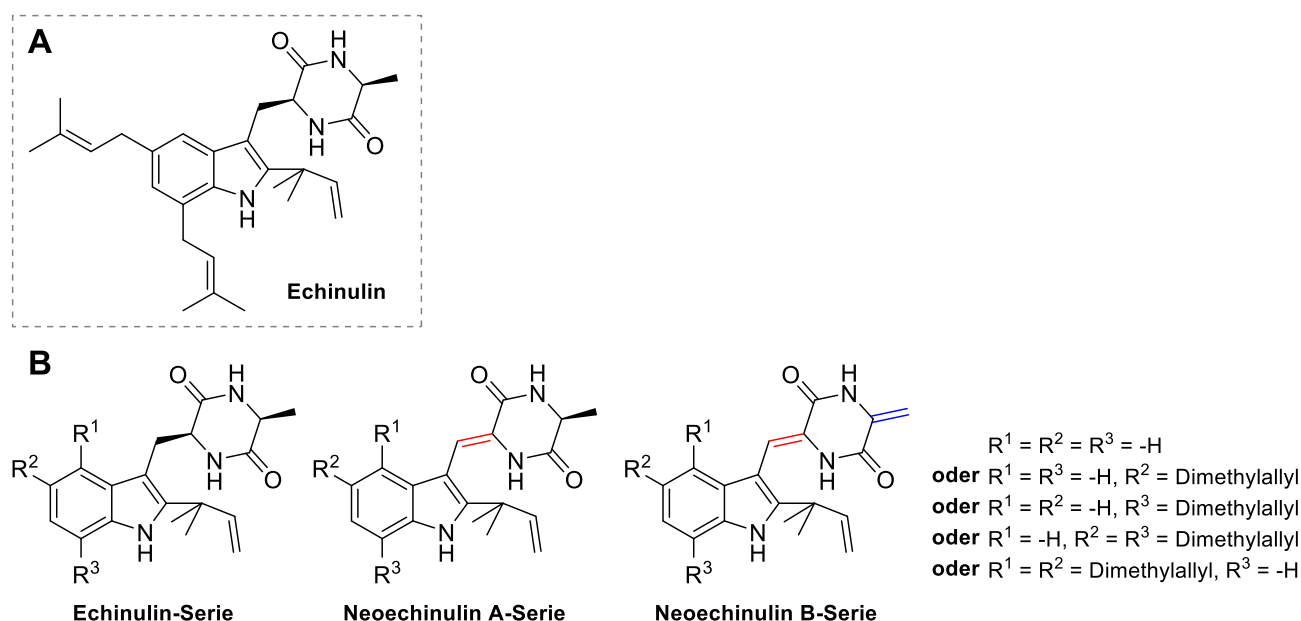


Abbildung 7: Strukturen von Vertretern der Echinulin-Familie

Wie viele andere Indoldiketopiperazine auch offenbaren Substanzen der Echinulin-Familie ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Biologische Aktivitäten von Substanzen der Echinulin-Familie

Biologische Aktivität	Referenz
Antiinflammatorische Effekte gegen LPS-stimulierte Makrophagen	112
Antioxidative Effekte als Radikalfänger gegen DPPH	113,114
Antivirale Aktivität als Schutz von MDCK-Zellen vor Influenza A H1N1 und Verhindern der Produktion infektiöser Hepatitis C-Viren	65,115
Immunosuppressive Eigenschaften gegen Proliferation von Milzlymphozyten der Maus	116
Neuroprotektive Eigenschaften gegen Peroxynitrit-induzierten Zelltod von PC12-Zellen	117
UV-protektive Eigenschaften	113

In einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe wurden durch Genome Mining drei homologe putative Gencluster für die Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie in *A. ruber*, *A. cristatus* und *A. glaucus* identifiziert. Es wurde gezeigt, dass EchPT1 (EYE98742) aus *A. ruber* die C2-reverse Prenylierung von cyclo-L-Trp-L-Ala katalysiert, während EchPT2 (EYE98746) dieses Produkt mehrfach konsekutiv an verschiedenen Positionen des Indolrings prenyliert.¹¹⁸

1.4.3 Kondensationsprodukte der Flavoglaucin-, Echinulin- und Anthrachinonderivate

Zusätzlich zu den einfachen Flavoglaucin-, Echinulin- und Anthrachinonderivaten konnten aus *A. ruber* mehrere Kondensationsprodukte isoliert werden. Ein Set dieser Stoffe sind spirozyklische Verbindungen, die wahrscheinlich durch eine Kopf-zu-Schwanz [4+2] Diels-Alder-Reaktion zwischen der Dien-Funktion in der Seitenkette eines Flavoglaucinanalogs und der Methylidengruppe eines Moleküls der Neoechinulin B-Serie entstehen. Cryptoechinulin D wurde erstmals 1976 aus *A. amstelodami* isoliert konnte später aber auch zusammen mit seinem 7-Isopentenylderivat in *A. ruber* entdeckt werden (Abbildung 8A).^{67,119} Aus verwandten Spezies wurden außerdem Stereoisomere und verschiedene „ortho“ oder „meta“ Produkte der Diels-Alder-Reaktion, wie z.B. Eurotinoid A – C oder Dihydrocryptoechinulin D, isoliert.¹²⁰ Außer 7-Isopentenylcryptoechinulin D besitzen alle diese Verbindungen antioxidative Eigenschaften und ein Racemat der Stereoisomere von Dihydrocryptoechinulin D weist Aktivität gegen mehrere Krebszelllinien auf.^{121,122}

Die Variocolortide hingegen setzen sich aus einem Molekül der Neoechinulin B-Serie und einem Anthrachinonderivat wie Catenarin oder Rubrocristin (Abbildung 5) zusammen und bilden ein „Spiro-Anthronopyranoid-Diketopiperazin“ Rückgrat. Variocolortid A – C, wurden zuerst aus *A. variegolor* isoliert, bis sie zusammen mit 7-O-Methylvariocolortid A auch in *A. ruber* identifiziert wurden.^{123,124} Auch von diesen Verbindungen wurden verschiedene Stereoisomere isoliert (Abbildung 8B). Variocolortid B und C, sowie 7-O-Methylvariocolortid A wirken inhibitorisch auf Caspase 3.¹²⁵

Die Motivation hinter der Aufklärung der Biosynthese von Flavoglaucin- und Echinulinanaloga wird durch ihre Fähigkeit über Kondensation komplexere Moleküle mit unterschiedlicher biologischer Aktivität zu bilden zusätzlich betont.

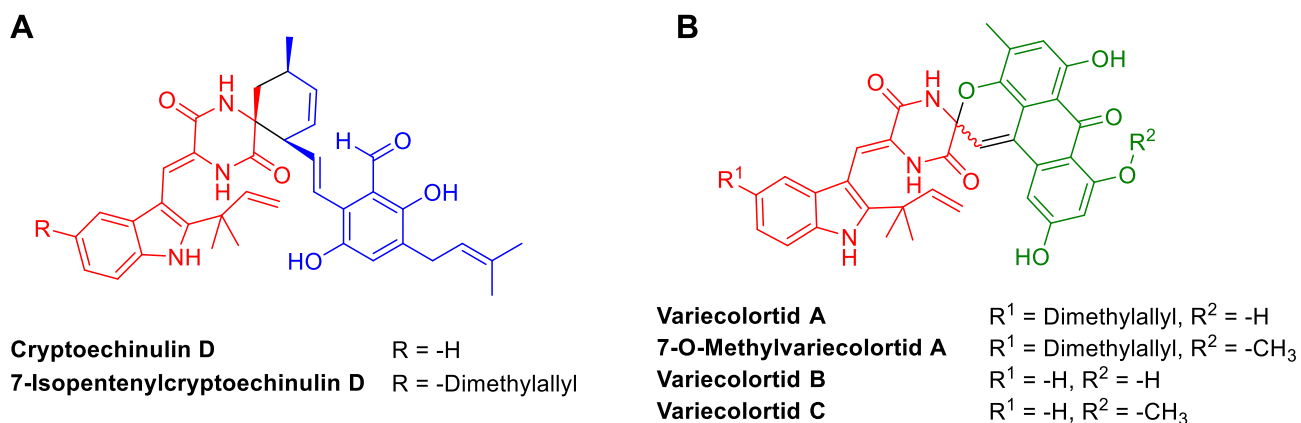


Abbildung 8: Spiro-Kondensationsprodukte aus *A. ruber*

Beide Arten an Spiroverbindungen bestehen aus einem Molekül der Neoechinulin B-Serie (rot) und entweder einem Flavoglaucinanalog (blau) (A) oder einem Anthrachinonderivat (grün) (B).

1.5 Sekundärmetabolite, biosynthetische Gencluster (BGCs) und Genome Mining

1.5.1 Primär- und Sekundärstoffwechsel

Der Stoffwechsel (Metabolismus) umfasst die Gesamtheit der chemischen Prozesse in einem Organismus, die zur Umwandlung von Stoffen führt. Dazu zählen neben der chemischen Konversion der Stoffe auch deren Aufnahme und Transport. Generell erfüllt der Stoffwechsel drei Aufgaben: die Umwandlung von Nährstoffen zum Gewinn von Energie, die zur Aufrechterhaltung von zellulären Prozessen benötigt wird; die Umwandlung von Nährstoffen und Energie zu Bausteinen für die Synthese überlebenswichtiger Substanzen wie Proteine, Nukleinsäuren, Lipide und einige Kohlenhydrate; und die Beseitigung von Stoffwechselendprodukten. Diese größtenteils Enzym-katalysierten Reaktionen ermöglichen es Lebewesen zu wachsen, sich fortzupflanzen, ihre morphologische und physiologische Struktur aufrechtzuerhalten und auf ihre Umgebung zu reagieren. Metabolische Reaktionen lassen sich in den Katabolismus und den Anabolismus unterteilen. Der Katabolismus bezeichnet den Abbau von komplexen oder einfacheren Nahrungsmolekülen oder Stoffwechselprodukten zum Zwecke der Energiegewinnung oder Entgiftung. Dabei entstehende Energie und Metabolite können als Bausteine für anabolistische Reaktionen genutzt werden. Der Anabolismus hingegen umfasst die Reaktionen, die unter Aufwand von Energie aus einfachen Bausteinen komplexere, körpereigene Substanzen aufbauen. Der Intermediärmetabolismus bzw. Amphibolismus bildet die Schnittstelle zwischen beiden Aspekten des Stoffwechsels. Stoffwechselreaktionen des Intermediärmetabolismus umfassen Konversionen von kleinen Metaboliten (<1000 Da), die sowohl den vollständigen katabolistischen Abbau der Moleküle zur Folge haben können oder auch kleine Moleküle als Ausgangsstoffe für die Biosynthese komplexerer Produkte zur Verfügung stellen.

Die Stoffwechselprozesse, die für das Wachstum, die Reproduktion, die Entwicklung, den Energiehaushalt und die allgemeine Vitalität des Organismus zuständig, also kurzum lebensnotwendig sind, werden als Primärstoffwechsel bezeichnet. Die darin involvierten Intermediate oder Produkte sind Primärmetabolite. Über diese Primärmetabolite hinaus entwickelten vor allem Pflanzen und Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze die Fähigkeit, ein reichhaltiges Arsenal an Sekundärmetaboliten zu synthetisieren. Diese Substanzen sind Resultat des sogenannten Sekundärstoffwechsels und erfüllen keine lebensnotwendigen Funktionen. Stattdessen vermitteln sie im Allgemeinen ökologische Interaktionen, die einen selektiven Vorteil für den Organismus bewirken können, indem sie seine Überlebensfähigkeit in der jeweiligen ökologischen Nische erhöhen. Sekundärmetabolite dienen unter anderem als chemische Signale für die Kommunikation, zur Verteidigung des Lebensraums oder zur Hemmung des Wachstums von Wettbewerbern.¹²⁶

Die hauptsächlichen Klassen an pilzlichen Sekundärmetaboliten sind Polyketide, Terpene oder Indolalkaloide und nicht-ribosomale Peptide.¹²⁷ Darüber hinaus sind auch hybride Sekundärmetabolite bekannt, wie z.B. Polyketid-nichtribosomale Peptidhybride oder bestimmte Meroterpenoide, die aus Polyketiden und Isoprenen bestehen.¹²⁸ Die Bausteine zum Aufbau der Sekundärmetabolite stammen aus zentralen Stoffwechselwegen und Primärmetabolitenpools. Dazu zählen diverse Acyl-CoAs

als Ausgangsstoffe für die Biosynthese von Polyketiden (z.B. Aflatoxin) und Terpenen (z.B. das Trichothecen Deoxynivalenol) oder Aminosäuren, die für die Bildung nicht-ribosomaler Peptid-Sekundärmetabolite (z.B. Penicillin G) oder Indolalkaloiden (z.B. Ergotamin) verwendet werden (Abbildung 9).¹²⁹

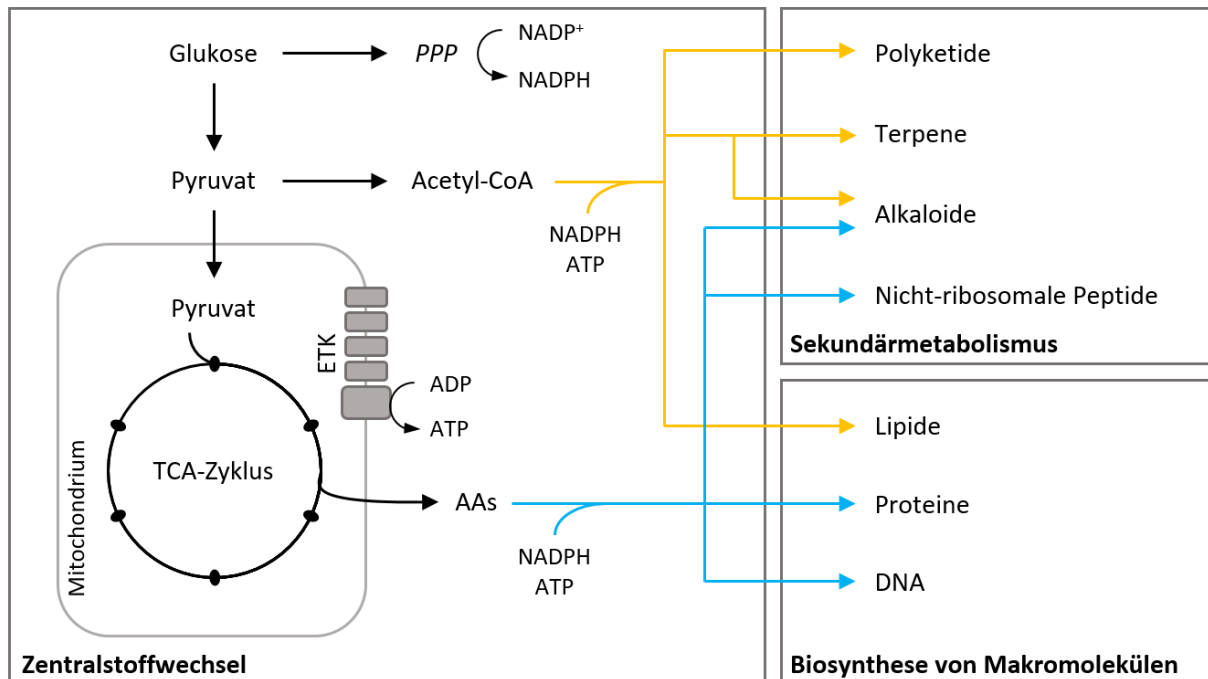


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Beziehung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel

PPP: Pentose-Phosphat-Weg; TCA-Zyklus: Tricarbonsäure-Zyklus; ETK: Elektronentransportkette. Abbildung modifiziert nach Abbildung 1 in Nielsen und Nielsen, 2017.¹³⁰

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, haben viele pilzliche Sekundärmetabolite Auswirkungen auf den Menschen und werden direkt oder als Basis zur Herstellung von Arzneimitteln verwendet.¹³¹ Angesichts der Schätzung über die große pilzliche Artenvielfalt und der Annahme, dass nur ein kleiner Teil der bekannten Pilze jemals auf die Herstellung biologisch aktiver Substanzen getestet wurde, ist es offensichtlich, dass noch eine Fülle an Naturstoffen mit potenziellem Nutzen für die Menschheit entdeckt werden kann.

1.5.2 Biosynthetische Gencluster (BGCs)

Schon in Zeiten der Analyse kürzerer genomischer Sequenzen vor der Sequenzierung kompletter Genome wurde entdeckt, dass die Gene für bestimmte Stoffwechselwege in Pilzen in Clustern vorliegen.¹³² Jeder dieser Cluster enthält in der Regel die Mehrheit, wenn nicht sogar alle Gene, die an dem relevanten Stoffwechselweg beteiligt sind. Diese Gene sind nebeneinander (d.h. geclustert) an einem spezifischen Ort im Genom angeordnet. Obwohl in Pilzen metabolische Gencluster an diversen Funktionen mit Beziehung zum Primärstoffwechsel (z.B. die Verwertung von Nitrat, Allantoin, Zuckern, Vitaminen und Aminosäuren) beteiligt sind, sind jedoch hauptsächlich Gene zur Produktion von Sekundärmetaboliten in biosynthetischen Genclustern (BGCs) angeordnet.^{133–135} In ihrer genomischen Organisation ähneln pilzliche BGCs Genclustern aus Prokaryoten (auch Operons genannt). In Pilzen

werden die Gene eines Clusters allerdings individuell transkribiert, während sie in prokaryotischen Operons zu einer einzigen polycistronischen mRNA transkribiert werden.¹³⁶ Dabei gibt es jedoch auch Ausnahmen.¹³⁷ Mittlerweile werden auch in Pflanzen immer mehr Sekundärmetabolitcluster entdeckt, obwohl dort Gene typischerweise unabhängig voneinander lokalisiert sind.¹³⁸ Das Gruppieren von Genen für die Biosynthese eines bestimmten Produkts kann aus verschiedenen Gründen auftreten. Die Hypothese, die im Moment am meisten vertreten wird, ist, dass das Clustern in eine gemeinsame physische Region dabei hilft eine koordinierte Regulation aller Gene eines BGCs aufrecht zu erhalten. Außerdem wurde postuliert, dass die Bewahrung eines Genclusters die Weitergabe eines kompletten Stoffwechselwegs durch sexuelle Transmission oder auch durch horizontalen Gentransfer ermöglicht.¹³⁹

Typische BGCs bestehen minimal aus Genen für eine Synthase bzw. Synthetase (Polyketidsynthase, nicht-ribosomale Peptidsynthetase, Terpensynthase und/oder -zyklase, Isocyanidsynthase), die aus Primärmetaboliten das Kohlenstoffrückgrat des jeweiligen Produkts bilden und modifizierenden Enzymen (z.B. Methyltransferasen, Cytochrom P450 Monooxygenasen, Hydroxylasen, Epimerasen, Oxidoreduktasen, Prenyltransferasen) die zur weiteren strukturellen Diversifikation des Produkts beitragen (Abbildung 10). Viele BGCs enthalten außerdem Gene für cluster-spezifische Transkriptionsfaktoren (TF), die die Expression der anderen Gene im Cluster positiv regulieren oder Gene, die für Proteine kodieren, die den Organismus selbst vor den toxischen Eigenschaften des produzierten Stoffs schützen. Außerdem sind in BGCs auch häufig hypothetische Gene zu finden, deren Funktion nicht eindeutig der Produktion eines Sekundärmetaboliten oder dem Schutz davor zugeordnet werden kann.¹²⁹

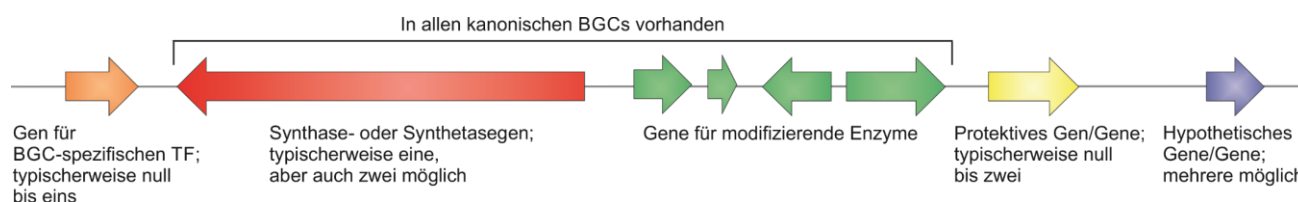


Abbildung 10: Die typischen Bestandteile eines pilzlichen biosynthetischen Genclusters

1.5.3 Entdeckung von BGCs und neuen Sekundärmetaboliten durch Genome Mining

Seit der ersten Sequenzierung des vollständigen Genoms eines freilebenden Organismus (*Haemophilus influenzae*) im Jahre 1995 und mit dem Abschluss des Human Genome Projects im Jahr 2000, welches das prestigeträchtigste Beispiel für eine Gesamt-Genom-Sequenzierung darstellt, befindet sich die Wissenschaft in der post-genomischen Ära.^{140,141} Das damit verbundene Aufkommen moderner Sequenzierungsmethoden (NGS – *next generation sequencing*) ermöglicht es, so einfach, schnell und kostengünstig wie noch nie zuvor ganze Genome von Organismen zu sequenzieren.¹⁴² Während die Kosten pro Megabase im Jahr 2001 noch bei 5292 US\$ lagen, konnte im Jahre 2013 ein komplettes menschliches Genom schon für etwa 5.000 US\$ sequenziert werden (Kosten in 2001: leicht unter 100.000.000 US\$).¹⁴³ Dies führte zu einem drastischen Anstieg an Daten komplett sequenzierter Genome von Organismen aus allen Domänen des Lebens. Die Anzahl prokaryotischer Genomdaten ist

der von Pilzen noch immer weit überlegen, allerdings nimmt die Menge verfügbarer hoch-qualitativer Daten von Pilzgenomen durch Anstrengungen wie dem „1000 fungal genomes project“ (<http://1000.fungalgenomes.org>) und vielen unabhängigen Sequenzierungen stetig zu.¹⁴⁴ Die Verfügbarkeit solcher Genomdaten und ihrer Annotation ermöglicht vergleichbare Analysen und Fortschritte in Bereichen wie der molekularen Phylogenetik, Mechanismen der pilzlichen Biologie (von sexueller Reproduktion bishin zu Virulenz), Resistenzmechanismen und vor allem auch der Produktion von Sekundärmetaboliten.^{145–147} Die bioinformatische Analyse von kompletten Genomen mit Schwerpunkt auf der Detektion und Zuordnung von BGCs und die darauf basierte Identifikation neuer Sekundärmetabolite wird als Genome Mining bezeichnet.

Die bioinformatische Detektion von potenziellen BGCs erfolgt nach automatisierter oder manueller Annotation der Genomdaten basierend auf der Homologie zu charakterisierten Genen und ihren Proteinprodukten. Dadurch ist es leicht, Gene zu finden, die beispielsweise für Synthasen oder Synthetasen aus dem Sekundärmetabolismus kodieren. Modifizierende Enzyme wie Oxidoreduktasen, Methyltransferasen, Cytochrom P450 Monooxygenasen etc. sind nicht nur exklusiv im Sekundärmetabolismus zu verorten, was eine reine Homologie-basierte Suche erschwert. Nichtsdestotrotz ist die Chance hoch, dass Gene, die für solche Enzyme kodieren, in die Produktion von Sekundärmetaboliten involviert sind, wenn sie auf dem Genom in der Nähe eines Synthase- / Synthetasegens zu finden sind.¹²⁷ Mit der Veröffentlichung von SMURF in 2010 (<http://smurf.jcvi.org/index.php>) und AntiSMASH im Jahr 2011 (<https://fungismash.secondarymetabolites.org/>) gibt es automatisierte Suchalgorithmen, die sich auf die Detektion von potenziellen BGCs in Genomdaten spezialisieren.^{148,149} Dabei basieren beide Algorithmen auf der Identifikation von konservierten Synthase-/Synthetasegenen, die innerhalb bestimmter räumlicher Parameter mit Genen assoziiert sind, die für mögliche modifizierende Enzyme kodieren.¹²⁹ Das Sortiment an Genome Mining-Algorithmen wurde und wird stetig durch zusätzliche Tools ergänzt.¹⁵⁰

Nachdem sich durch die Veröffentlichung der Genomdaten von *A. fumigatus*, *A. nidulans* und *A. oryzae* im Jahre 2005 herauskristallisierte, dass Biosynthesegene für Sekundärmetabolite wirklich zu überwiegendem Teil geclustert vorliegen, wurde die Wissenschaft zum ersten Mal mit der großen Anzahl an BGCs in Pilzen konfrontiert.¹⁵¹ Analysen mit Genome Mining-Algorithmen legen mittlerweile nahe, dass pro sekundärmetabolitreicher Pilzspezies 30 – 70 BGCs detektiert werden, was nach Hochrechnungen, unter Berücksichtigung verschiedener Pilzspezies und möglichen Duplikaten mit gleicher Funktion, zu einer Zahl von mehreren Millionen unentdeckter BGCs führt.¹²⁹ Die Menge der BGCs übersteigt die Anzahl der bisher entdeckten und erforschten Sekundärmetabolite bei weitem, was darauf hindeutet, dass das Reich der Pilze das Potenzial besitzt, außergewöhnlich viele neue Substanzen von eventuellem Nutzen für die Menschheit zu produzieren.

Der Grund dafür liegt darin, dass ca. 90 % der BGCs unter Laborbedingungen nicht oder nur gering exprimiert werden. Das erschwert die Zuordnung bekannter Sekundärmetabolite zu ihren BGCs und verhindert die einfache Identifikation neuer Produkte.¹⁵² Gencluster mit keiner oder nur geringer Expression werden als „still“ bezeichnet. Die Cluster, deren Produkte noch nicht identifiziert wurden oder *vice versa*, betitelt man als „kryptisch“. Die Existenz stiller BGCs lässt sich dadurch erklären, dass

die Produktion von Sekundärmetaboliten für die Zelle mit Kosten verbunden ist. Sowohl Energie als auch Ressourcen müssen in die Herstellung der Biosyntheseenzyme, der Vorläufermoleküle und der eigentlichen Substanzen investiert werden. Das hat zur Folge, dass die Biosynthese von Sekundärmetaboliten streng reguliert und in Antwort auf spezifische Stimuli aus der Umwelt aktiviert wird, was dem Organismus dabei hilft, seine Fitness in der jeweiligen Situation zu erhöhen.¹⁵³ Um dieses verborgene Potenzial für die Produktion von Sekundärmetaboliten und die Identifizierung neuer Naturstoffe auszuschöpfen, wurden verschiedene Strategien zur Aktivierung dieser stillen Gencluster entwickelt.¹⁵⁴

1.5.4 Strategien zur Untersuchung von BGCs und ihren Sekundärmetaboliten

Die Beobachtung, dass es einem Stamm möglich ist, unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen unterschiedliche Naturstoffe zu produzieren, führte zur OSMAC (*one strain many compounds*)-Strategie.¹⁵⁵ Diese Strategie ist einfach zu verfolgen und erfordert keine genetische Manipulation des Organismus, da durch Anpassung der Medienkomposition, des pHs, der Sauerstoffversorgung, der Kultivierungstemperatur, der Beleuchtung, der Beigabe von chemischen Inhibitoren bzw. Wachstumsverstärkern etc. die Bildung verschiedener Metabolite angeregt werden kann. Dieser Ansatz wurde schon oft erfolgreich verfolgt und resultierte z.B. in der Isolierung der kryptischen Substanzen Aspvanicin A und B aus *A. versicolor* KU258497 oder eines neuen zytotoxischen Furanesterderivats aus *A. niger* BRF-074.^{156,157}

Im Gegensatz zur axenischen Kultivierung des relevanten Organismus verfolgt die Ko-Kultivierung von zwei oder mehreren verschiedenen Organismen die Nachahmung der natürlichen Umgebung von Mikroben mit dem Effekt die Expression stiller Gencluster zu aktivieren. Die Interaktionen zwischen den Spezies durch Konkurrenz um Nährstoffe oder Platz und die Aktivierung chemischer Verteidigungsmechanismen kann zu einer dramatischen Veränderung des Sekundärmetabolitprofils führen.¹⁵⁸ In einer besonders erfolgreichen Anwendung dieser Methode wurde durch die Ko-Kultivierung von *Chaetomium* sp. mit lebendigen oder autoklavierten *Bacillus subtilis* die Identifikation fünf neuer Substanzen und eine bis zu 8,3-fach höhere Akkumulierung bekannter Produkte erreicht.¹⁵⁹

Beide Ansätze verursachen eine Änderung der vom Organismus wahrgenommenen Umgebungsbedingungen. Zur Verarbeitung dieser externen Stimuli und zur Anpassung oder Reaktion an diese Änderungen entwickelten Organismen im Laufe der Evolution eine Kombination aus komplexen sensorischen Systemen und strikt regulierten genetischen Schaltkreisen mit Einfluss auf Stoffwechselwege. In diesen regulatorischen Netzwerken stellen Transkriptionsfaktoren wichtige Schlüsselspieler dar. Die Hierarchie bei der Regulation durch diese genetischen Schaltkreise reicht dabei von gen- oder clusterspezifischen Transkriptionsregulatoren bis hin zu globalen Regulationskomplexen. Nahezu die Hälfte aller pilzlichen BGCs kodieren für einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren, die die Regulation des jeweiligen Clusters beeinflussen.^{160,161} Meistens handelt es sich dabei um Zn(II)2Cys6-Proteine. Es ist auch bekannt, dass ein Teil dieser clusterspezifischen Transkriptionsfaktoren Gene anderer BGCs und mehrerer Stoffwechselwege regulieren können, z.B. in Antwort auf die Verfügbarkeit von Eisen.^{162,163} Einige eher allgemeine Transkriptionsfaktoren, wie die pH- bzw. stickstoff- oder kohlen-

stoffquelleabhängigen Regulatoren PacC, AreA oder CreA, können die Produktion von Sekundärmetaboliten auf breiterer Ebene sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen.¹⁶⁴ Der Velvet-Komplex ist einer der einflussreichsten Transkriptionsregulatoren und wurde insbesondere in *A. nidulans* exzessiv erforscht. Dieser heterotrimere Komplex besteht aus den drei Einzelproteinen LaeA, VeA und VelB und verbindet den lichtabhängigen Einfluss auf die pilzliche Morphologie und Entwicklung mit dem Sekundärmetabolismus.¹⁶⁵ Es wurde gezeigt, dass LaeA etwa die Hälfte aller BGCs in Pilzen positiv beeinflusst und ein Verlust von LaeA in der verringerten Produktion von Sekundärmetaboliten resultiert.¹⁶⁶ Dieser immense Einfluss von Transkriptionsregulatoren auf den Sekundärstoffwechsel macht sie zu einem attraktiven Ziel für die Aktivierung von stillen Genclustern. Gezielte Überexpression von clusterspezifischen Zn(II)2Cys6-Transkriptionsfaktoren führte beispielsweise zur Produktion und Identifikation von Aspyridon, Aperfuranon, Monodictyphenon und *ent*-Pimara-8(14),15-dien als Produkte von andernfalls stillen BGCs in *A. nidulans*.^{167–170} Als berühmtester globaler Regulator mit Einfluss auf den Sekundärmetabolismus war LaeA in *A. nidulans* und seine Homologe in anderen Ascomyceten schon häufiger Ziel von Deletions- und Überexpressionsexperimenten. Erfolgreiche Aktivierung von stillen BGCs durch die Modifikation von LaeA in verschiedenen Pilzen führte zur Entdeckung von Terrequinone A in *A. nidulans*, ML-236B in *P. citrinum*, Endocrocin und Hexadehydroasterchrom in *A. fumigatus*, Fusarinsäure in *F. verticillioides* und diversen Tyrosin-derivatisierten Alkaloiden in *A. flavus*.¹⁷¹

Außer der direkten Steuerung der Expression von BGCs durch Transkriptionsfaktoren kann die transkriptionelle Aktivität eines Clusters auch durch epigenetische Modifikationen von Chromatin beeinflusst werden. Je dichter die DNA um Histon- und nicht-Histonproteine gepackt ist (Heterochromatin vs. Euchromatin), desto unzugänglicher ist der jeweilige Bereich für Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen, was in einer sinkenden oder komplett eingestellten Transkription resultiert. Neben der Methylierung von Histonen und DNA beeinflusst auch die Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder Sumoylierung von Histonen die globale Genexpression.^{172,173} Durch gezielte Ausschaltung oder Überexpression Chromatin-modifizierender Enzyme kann eine Entspannung von andernfalls dicht gepackten DNA Bereichen zur Aktivierung von stillen BGCs führen: Die Entfernung einer Komponente des Proteinkomplexes, verantwortlich für die Methylierung von Histon3-Lysin4, bewirkte die Identifikation der Monodictyphenon und Orsellinsäure/F9775 BGCs in *A. nidulans*.^{169,174,175} Die Zugabe eines chemischen Inhibitors einer Histondeacetylase zu *A. niger*-Kulturen führte zur Entdeckung des zuvor unbekannten Sekundärmetaboliten Nygeron A.¹⁷⁶

Eine weitere Möglichkeit die Expression stiller BGCs zu induzieren, ist die Manipulation von Ribosomen oder RNA-Polymerasen. Es wurde gezeigt, dass Mutationen des ribosomalen Proteins S12 oder der RNA-Polymerase vor allem in *Streptomyces* spp. aber auch in Pilzen wie *P. purpurogenum* die erhöhte Produktion von bekannten oder auch zuvor nicht-produzierten Antibiotika induziert.^{177,178}

Die Isotopen-basierte Fraktionierung in Verbindung mit Genomsequenzanalysen führte 2007 zum ersten Mal zur Zuordnung eines kryptischen BGCs zur Biosynthese von Orfamid A in *Pseudomonas fluorescens* und wird seitdem immer wieder für die Verbindung von beobachteten Sekundärmetabo-

liten und ihren Genclustern eingesetzt.^{179–181} Die Isotopen-basierte Fraktionierung birgt das Potenzial, neue Metaboliten schnell und ohne genetische Manipulation zu identifizieren. Dieser Ansatz erfordert jedoch optimale Expressionsniveaus des untersuchten biosynthetischen Genclusters.

Über die hier diskutierten Strategien zur Untersuchung und Aktivierung von bakteriellen oder pilzlichen BGCs hinaus gibt es noch viele weitere Methoden, die schon erfolgreich angewandt wurden.^{126,154,171,182}

1.5.5 Heterologe Expression von BGCs in Modellorganismen

Die Überexpression oder Deletion einzelner Clustergene bzw. Regulatoren zur Aktivierung oder Untersuchung von BGCs setzt eine etablierte genetische Manipulierbarkeit des relevanten Organismus voraus. Außerdem lassen sich viele Organismen unter Laborbedingungen nicht oder nur bedingt kultivieren, was dazu führt, dass der Zugang zu diesen Organismen in den meisten Fällen nur über gewonnene Proben (v.a. genetisches Material) möglich ist. Aus diesen Gründen stellt die heterologe Expression von Genen in Modellorganismen schon seit langem eine der Basismethoden in der Molekularbiologie und Proteinbiochemie dar. Diese Modellorganismen sind exzessiv erforscht und bieten etablierte Protokolle zur gezielten genetischen Manipulation. Abhängig vom Ursprungsorganismus und den Anforderungen an das exprimierte Gen bzw. das produzierte Protein kann zwischen prokaryotischen oder eukaryotischen Modellorganismen gewählt werden. Während prokaryotische Systeme wie *Escherichia coli* Vorteile wie beispielsweise schnelles Wachstum (die Verdopplungszeit unter Optimalbedingungen beträgt nur 20 min), schnelle und einfache Transformation mit exogener DNA oder das einfache Erreichen von Zellkulturen mit einer hohen Zelldichte bieten, haben diese allerdings den Nachteil, dass Proteine nicht posttranslational modifiziert werden und ein Spleißen von Introns nicht möglich ist.^{183,184} Neben der dadurch erzwungenen Herstellung und Nutzung von cDNA führt das dazu, dass die Expression eukaryotischer Proteine, deren posttranslationale Modifikationen einen essenziellen Beitrag zur Funktion des Proteins leisten, in prokaryotischen Systemen nicht durchführbar ist. Trotz der Optimierung von *E. coli* zur Expression von Proteinen aus höheren Organismen werden in solchen Fällen zumeist eukaryotische Systeme verwendet, die von Mikroorganismen wie Hefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*) und anderen Ascomyceten (z.B. *Aspergillus* oder *Trichoderma*) über Insektenzellen bis zu Säugetierzellen reichen können.^{185,186}

Die heterologe Expression ist auch in der Forschung zur Naturstoffbiosynthese nicht wegzudenken und zeichnet sich hier durch besondere Vorteile aus. Durch die Entwicklung fortgeschrittener DNA-Manipulationstechniken und Klonierungsmethoden ist es möglich, nicht nur einzelne Gene zur Produktion eines spezifischen Proteins zu exprimieren, sondern über verschiedene Methoden ganze Gencluster in den Modellorganismus einzubringen.^{187,188} Ligationsunabhängige Klonierungsmethoden wie die homologe Rekombination in *E. coli* oder *S. cerevisiae* ermöglichen beim Zusammenbau der BGCs auch den Austausch gewünschter Sequenzen, wie z.B. Promotoren, um stille BGCs unter Laborbedingungen zu aktivieren.^{189,190} Obwohl die Produktion von Naturstoffen durch heterologe Expression zwar durch wirtsspezifische biosynthetische bzw. regulatorische Elemente beeinflusst werden kann und eine breitere Auswahl an Expressionssystemen möglicherweise eine robustere heterologe Expression verspricht, fällt die erste Wahl dennoch meist auf ein dem Ursprungsorganismus

nahe verwandtes System.^{191,192} Vor allem im Hinblick auf die Wachstumsrate, das Temperaturoptimum, das Spleißen von Introns und die Verfügbarkeit von Vorläufermolekülen bieten diese zumeist einen Vorteil.

Die erste komplette Rekonstruktion ganzer Sekundärmetabolitpathways wurde durch stückweise Einführung von Genen der Penicillin-, Tenellin-, Pyripyropen- und Aphidicolin-BGCs in *A. oryzae* erreicht.^{193–196} Über verschiedene Assemblierungsmethoden wurde seitdem eine Vielzahl an pilzlichen BGCs rekonstituiert und erfolgreich heterolog exprimiert.^{187,188}

1.6 Enzyme der Sekundärmetabolitbiosynthese

Wie schon zuvor erwähnt, beginnt die Biosynthese von Sekundärmetaboliten über die Herstellung des Kohlenstoffgrundgerüsts durch verschiedene Enzymklassen wie Polyketidsynthasen (PKS), Terpensynthasen bzw. -zyklen oder nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS). Die weitere strukturelle Diversifikation wird über die Modifikation des Kohlenstoffgrundgerüsts mit modifizierenden Enzymen wie Methyltransferasen, Cytochrom P450 Enzymen, Hydroxylasen, Epimerasen, Oxidoreduktasen oder Prenyltransferasen gewährleistet. Die Ausgangsstoffe, die zur Biosynthese dieser Substanzen benötigt werden, stammen aus dem Primärstoffwechsel. In diesem Kapitel werden einige, für diese Arbeit relevante, Enzymklassen näher beschrieben.

1.6.1 Polyketide und Polyketidsynthasen (PKS)

Polyketide sind eine vielfältige Gruppe von Naturstoffen mit hochkomplexen Kohlenstoffgrundgerüsten, wie u.a. Polyphenole, Polyene, Makrolide, Endiine oder Polyether. Die biologische Funktion im Kontext ihrer natürlichen Umgebung und der Nutzen für den ursprünglichen Produzenten ist oftmals nicht genau vorherzusagen, doch im Allgemeinen fungieren viele Polyketide als Virulenzfaktoren, Pigmente und Abwehr- oder Botenstoffe.¹⁹⁷ Aufgrund ihres pharmazeutischen Nutzens finden viele Polyketide Einsatz in der Medizin oder dienen als Grundlage für die weitere Entwicklung von Arzneimitteln. In der Spanne von 2005 bis 2007 gehörten mehr als ein Drittel der als Arzneimittel zugelassenen Naturstoffe oder Naturstoffderivate zu den Polyketiden und bis 2009 erreichte der Jahresumsatz mit aus Polyketiden gewonnenen Arzneimitteln routinemäßig 20 Milliarden Dollar, was die Relevanz dieser Substanzklasse in der Entwicklung neuer Medikamente unterstreicht.¹⁹⁸ Pharmazeutisch relevante Polyketide umfassen Antibiotika (z.B. Erythromycin, Actinorhodin, Tetracenomycin oder Tetracyclin), Chemotherapeutika (z.B. Doxorubicin, Resistomycin oder Plicamycin), Antioxidantien (z.B. Resveratrol) (Abbildung 11), Antimykotika (z.B. Griseofulvin oder Amphotericin), Cholesterolsenkende Mittel (z.B. Lovastatin) sowie Toxine und Karzinogene (z.B. Aflatoxin B₁) (Abbildung 2A und B).¹⁹⁹

Trotz ihrer strukturellen Diversität werden Polyketide über ihren gemeinsamen biosynthetischen Ursprung aus der Kondensation einfacher Acyl-CoA-Thioester definiert. Schon in der Fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurden durch Experimente mit Radioisotop-markiertem Acetat Parallelen zur

Fettsäurebiosynthese festgestellt, bei der von Fettsäuresynthasen (FASs) durch iterative Kondensation von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA mit anschließender mehrfacher Reduktion der Ketogruppen Fettsäuren mit langen Kohlenstoffketten synthetisiert werden.²⁰⁰ Die von Polyketidsynthasen katalysierten Reaktionen laufen generell ähnlich ab.

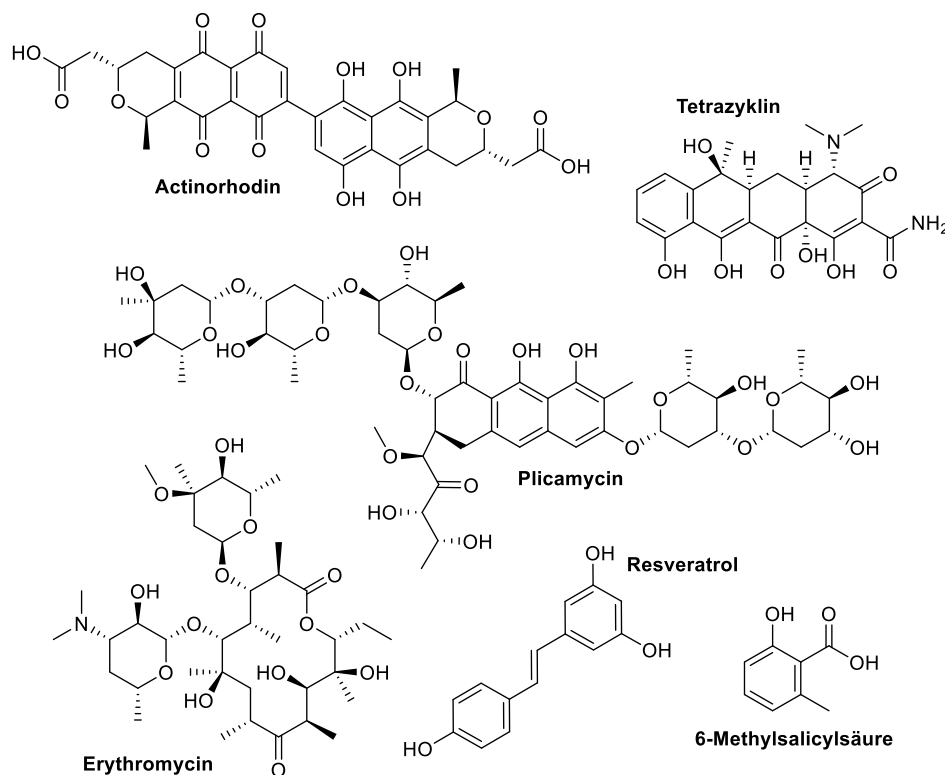


Abbildung 11: Beispiele für die strukturelle Diversität von Polyketiden

Polyketidsynthasen sind Enzyme mit multiplen funktionellen Domänen oder ganze Enzymkomplexe, deren essenzielle Funktion darin besteht, einfache aktivierte Acyl-Startereinheiten (z.B. Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, Methylmalonyl-CoA etc.) über iterative decarboxylierende Claisen-Thioester-Kondensation mit Malonyl-CoA oder davon abgeleiteten Erweiterungseinheiten zu verketteten (Abbildung 12A und B).¹⁹⁷ Diese Reaktion wird von einer β -Ketosynthase (KS) katalysiert. Die Startereinheit bzw. die wachsende Kohlenstoffkette wird dabei als Thioester-Konjugat an einem phosphopantetheinylierten Acyl-Carrier-Protein (ACP) oder Coenzym A verankert. Eine optionale (Malonyl-)Acyltransferase (MAT/AT) erkennt und überträgt spezifisch Starter- oder Erweiterungseinheiten auf den Phosphopantetheinyllarm des ACP. Diese drei Funktionen bilden zusammen mit einer Thioesterase (TE), die durch Hydrolyse des Acyl-Thioesters die Freisetzung des Polyketids bewirkt, die einfachste funktionelle PKS. Die Reduktion der β -Oxo-Funktion nach jedem Elongationsschritt ist bei PKS im Vergleich zu FAS hingegen optional und wird durch drei weitere enzymatische Funktionen katalysiert. Die Ketoreduktase (KR) reduziert das β -Keton zum entsprechenden β -Alkohol, die Dehydratase (DH) eliminiert den entstandenen β -Alkohol als Wasser und bildet einen Enoyl-Thioester gefolgt von der Reduktion dieses Enoyl-Thioesters zum gesättigten Acyl-Thioester durch die Enoylreduktase (ER). Das teilweise oder vollständige Auslassen der Reduktionsschritte vor der nächsten Verlängerungsrunde

resultiert damit in einem komplexen Funktionalisierungsmuster der PKS-Primärprodukte. Neben diesem Aspekt unterscheiden sich PKS von FAS auch noch in der größeren Auswahl verschiedener Startereinheiten und in der Herstellung von Produkten mit unterschiedlicher Kettenlänge. Die strukturelle Variation des Kohlenstoffrückgrats wird durch zusätzliche Modifikationen des wachsenden Polyketids mittels optionaler, PKS-inherenter Faktoren oder Domänen weiter erhöht. Dazu zählen beispielsweise Methylierungen (katalysiert von Methyltransferasen (MT)) und unterschiedliche Zyklisierungs- bzw. Freisetzungsmechanismen. Die freigesetzten Primärprodukte werden im Anschluss meistens durch Oxidation, Reduktion, Umlagerung oder Transferreaktionen von anderen Enzymen des Stoffwechselwegs weiter diversifiziert.^{201,202}

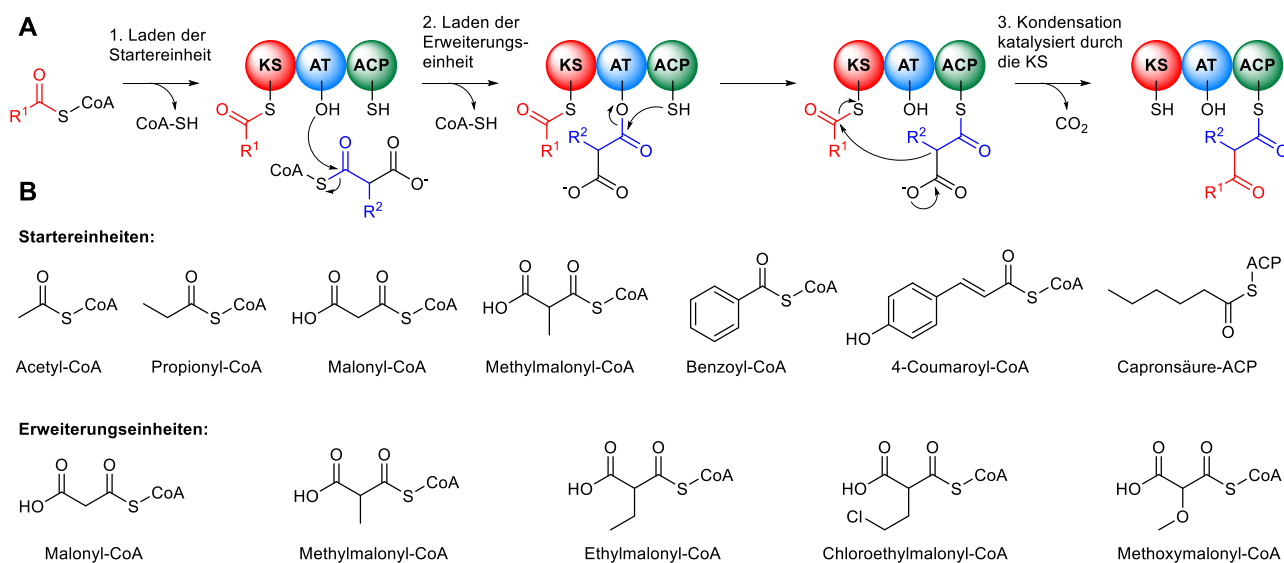


Abbildung 12: Genereller Mechanismus der Kettenverlängerung durch PKS und mögliche Starter- bzw. Erweiterungseinheiten

Der generelle Mechanismus der Bildung von Polyketiden durch PKS (**A**) involviert das Laden einer Startereinheit, einer Erweiterungseinheit und deren Claisen-Kondensation unter Abspaltung von CO_2 . Durch wiederholte Kondensation mit weiteren Erweiterungseinheiten wird die Polyketidkette verlängert. Die typischen Starter- und Erweiterungseinheiten (**B**) sind Acetyl-CoA und Malonyl-CoA, die abgebildeten Alternativen werden jedoch ebenfalls von bekannten PKS inkorporiert.

Auf Basis ihrer Strukturen und Wirkmechanismen werden PKS in drei unterschiedliche Typen eingeteilt: Typ I und Typ II – die dabei die Beziehung zu den zuvor charakterisierten Typen I und II von Fettsäuresynthasen reflektieren – und Typ III (Tabelle 3). Dieses Paradigma gilt aber keineswegs einheitlich, da viele PKS auch ein hybrides Verhalten offenbaren und sich immer mehr Beispiele dafür finden lassen, dass in der Evolution von Polyketidsynthasen unzählige Zwischenstufen realisiert wurden.^{203–206} Es geht sogar so weit, dass in manchen Fällen Module von Typ I-PKS an NRPS-Module gebunden sind, was zur Biosynthese von Polyketid-Peptid-Hybridprodukten führt oder einige Polyketide durch Zusammenarbeit von PKS verschiedener Typen entstehen.^{207,208}

Tabelle 3: Klassische Kategorisierung von PKS

Typ	Proteinarchitektur	Synthesemechanismus	Vorhersage des Produkts	Ähnlichkeiten zu	Organismen
Typ I (modular)	Einzelnes Protein mit mehreren Modulen	Linear (fließbandartig), jede katalytische Domäne wird einmal genutzt	bedingt	-	Bakterien
Typ I (iterativ)	Einzelnes Protein mit mehreren funktionellen Domänen (ein Modul)	Iterativ, die katalytischen Domänen werden wiederholt genutzt	nein	FAS Typ I	hauptsächlich Pilze, einige Bakterien
Typ II	Multiple Proteine, jedes mit einer eigenen mono-funktionalen katalytischen Domäne	Iterativ, die katalytischen Domänen werden einmalig oder wiederholt genutzt	nein	FAS Typ II	ausschließlich Bakterien
Typ III	Einzelnes Protein mit mehreren Modulen	Iterativ, die katalytischen Domänen werden wiederholt genutzt	nein	-	hauptsächlich Pflanzen, einige Bakterien und Pilze

1.6.1.1 Modulare Typ I-PKS

Typ I-PKS sind strukturell in kovalent miteinander verknüpfte funktionelle Domänen organisiert und bilden ein großes multifunktionales Enzym. Basierend auf der iterativen oder nicht-iterativen Katalyse der Claisen-Kondensation durch eine einzige KS-Domäne kann auch noch zwischen iterativen und nicht-iterativen bzw. modularen Typ I-PKS unterschieden werden. Ein Modul der nicht-iterativen Typ I-PKS besteht typischerweise aus einem Satz von AT-, KS-, ACP- und optionalen β -Keto-Reduktionsdomänen; d.h. die Domänen, die für die Addition einer einzelnen Ketideinheit an das wachsende Polyketid und die folgende Modifikation verantwortlich sind, bilden ein funktionelles Modul. Nicht-iterative Typ I-PKS sind riesige, multimodulare Megasyntasen, in denen das wachsende Polyketid von Modul zu Modul weitergegeben wird, nachdem von Jedem typischerweise nur eine Erweiterungseinheit ergänzt und entsprechend der Domänenarchitektur modifiziert wurde (fließbandartig). Dem entsprechend korreliert die Anzahl der Module mit den durchgeführten Elongationszyklen und die Anwesenheit von KR-, DH- oder ER-Domänen in den Modulen bestimmt den Reduktionsgrad des jeweiligen β -Ketons.²⁰⁸ Diese Kollinearität ermöglicht es nicht nur aus dem Aufbau der Megasyntase auf die Struktur des Primärmetaboliten zu schließen, sondern erlaubt auch die rationale Umprogrammierung von Modulen durch Protein-Engineering.^{209,210} Ausnahmen in dieser 1:1-Beziehung zwischen PKS-Architektur und Metabolitstruktur kommen z.B. durch das Überspringen oder das Wiederverwenden eines Moduls in einigen bakteriellen modularen Typ I-PKS zustande, was dazu führen kann, dass die tatsächliche Struktur nicht mit der postulierten Struktur zusammenpasst.^{204,206} Das Gleiche gilt für die Korrelation zwischen der Modularchitektur und der Produktstruktur, die besonders im

Fälle der Unterklasse der *trans*-AT-PKS von den Erwartungen abweicht. Im Gegensatz zu *cis*-AT-PKS fehlen den Modulen von *trans*-AT-PKS die AT-Domänen, deren ACPs stattdessen durch freie, separate ATs beladen werden.²¹¹

Die 6-Desoxyerythronolid B-Synthase (DEBS) synthetisiert das Macrolidgrundgerüst in der Biosynthese von Erythromycin A und ist für diese Enzymklasse ein archetypisches Beispiel (Abbildung 13).²¹² Hierbei zeigt sich auch, dass nicht jedes Modul einer modularen Typ I-PKS als distinktes Protein vorliegen muss, stattdessen setzt sich die DEBS aus drei Proteinen zusammen, die ein Modul für die Beladung der PKS mit der Startereinheit, sechs Erweiterungsmodule und eine TE-Domäne zur Freisetzung des Macrolids umfassen.²¹³

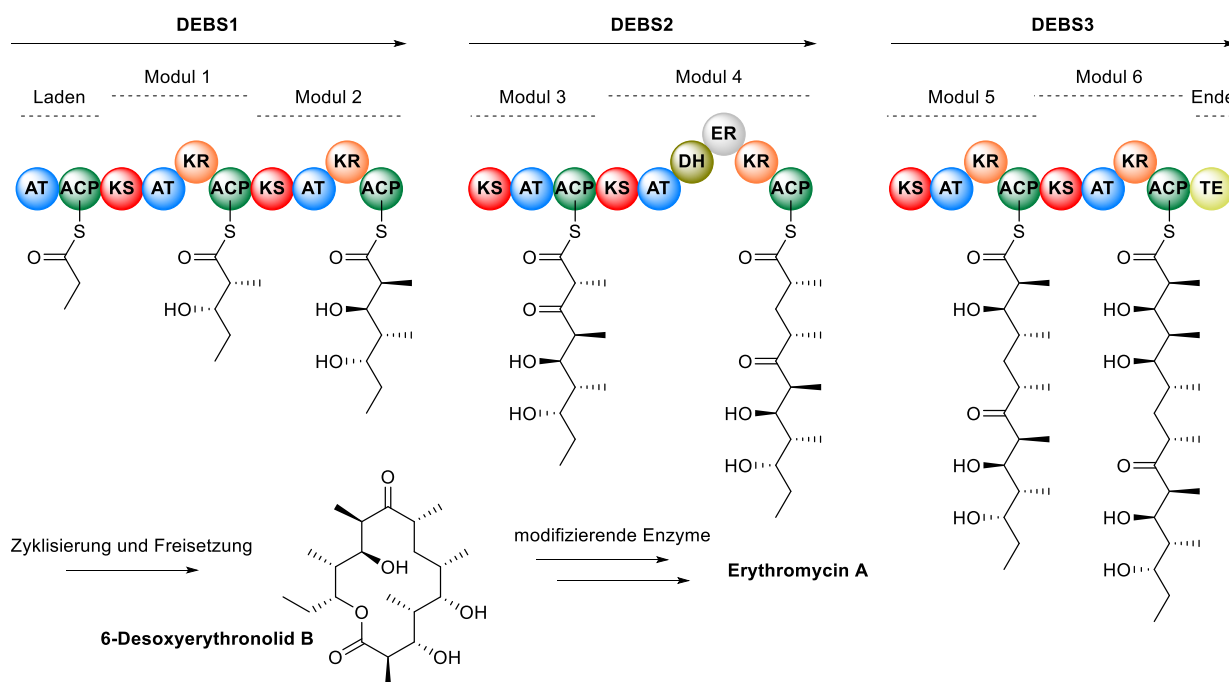


Abbildung 13: Die 6-Desoxyerythronolid B-Synthase (DEBS) als repräsentatives Beispiel für modulare PKS

Die drei separaten Proteine der DEBS katalysieren die fließbandartige Kondensation und Prozessierung von Propionyl-CoA mit sechs Molekülen Methylmalonyl-CoA. Das Polyketid wird unter Zyklisierung von der TE-Domäne als 6-Desoxyerythronolid B abgespalten, bevor dieses von weiteren Enzymen des Pathways zu Erythromycin A umgesetzt wird.

1.6.1.2 Iterative Typ I-PKS – Nicht-reduzierende PKS

Im Gegensatz zu den bakteriellen modularen Enzymen durchläuft das wachsende Polyketid im Falle der pilzlichen iterativen Typ I-PKS die funktionellen Domänen eines Polypeptids mehrfach. Anhand ihrer Domänenarchitektur kann zwischen drei verschiedenen Subtypen unterschieden werden. Nicht-reduzierende PKS (NR-PKS) führen bei der Kettenverlängerung keine reduktiven Schritte durch, partiell-reduzierende PKS (PR-PKS) katalysieren die Reduktion des β -Ketons nur in limitiertem Maße und hoch-reduzierende PKS (HR-PKS) können das Polyketid bis hin zur vollen Sättigung reduzieren. Trotz der gewöhnlich iterativen Prozessierung des wachsenden Polyketids, kann der Reduktionsgrad in jeder verlängerten Einheit dennoch variieren. Das heißt, je nach Anwesenheit werden in jedem Elongationsschritt optional KR-, DH-, ER- oder sogar MT-Domänen eingesetzt, um die Reduktion der

β -Oxo-Funktion oder auch Methylierungen des α -Kohlenstoffs durchzuführen und damit das Substitutionsmuster festzulegen. Der Modus der Methylierung ist ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen pilzlichen iterativen PKS und bakteriellen PKS. Während bakterielle Systeme Methylmalonyl-CoA oder andere Derivate von Malonyl-CoA als Erweiterungseinheiten verbauen können, methylieren pilzliche Systeme die wachsende Polyketidkette ausschließlich durch eine Methyltransferase-Domäne, welche S-Adenosylmethionin (SAM) als Kofaktor benötigt.²⁰¹

Die minimale Domänenarchitektur einer NR-PKS umfasst für gewöhnlich eine N-terminale Startereinheit-AT (SAT)-Domäne, gefolgt von jeweils einer KS-, AT-, Produkttemplat (PT)- und einer ACP-Domäne.²¹⁴ Die SAT wählt und lädt die Startereinheit. Der Starter besteht entweder aus Acetat, einem anderen Polyketid (wie das hoch-reduzierte Triketid, welches bei der Chaetoviridinbiosynthese von der HR-PKS CazF auf die NR-PKS CazM übertragen wird)²¹⁵ oder einer Fett-Acyl-Kette (wie Capronsäure im Falle der Norsolorinsäuresynthase (NSAS) als erstes Enzym der Aflatoxinbiosynthese in *A. flavus* (Abbildung 14)).²¹⁶ Die AT-Domäne lädt die Malonat-Erweiterungseinheiten und die KS katalysiert die Claisen-Kondensation zur Verlängerung der ACP-gebundenen Acyl-Kette.²¹⁷ Die Programmierung der PT-Domäne bestimmt die Regiospezifität und den Zeitpunkt der genauen Zyklisierung des linearen Polyketids und schützt die wachsende Kette in einer protektiven Tasche, welche aufgrund der vielen polaren Keto-Funktionen instabil wäre und chaotisch zyklisieren würde.²⁰¹ Die PT-Domäne von PksA (Teil der NSAS) (Abbildung 14) vermittelt zwei sukzessive Aldol-Kondensationen zwischen C4-C9 und anschließend C2-C11. Nach der Claisen-Zyklisierung von C14-C1 durch die Thioesterase/Claisen-Zyklase (TE/CLC)-Domäne wird das Polyketid als Noranthron von PksA abgespalten.²¹⁸ Alternative Zyklisierungsmuster, die beispielsweise mit einer Aldol-Kondensation von C2-C7 oder C6-C11 beginnen, führen unter anderem zur Bildung von Naphtopyron YWA1 durch die wA-PKS oder Atrochryson-Carbonsäure durch die Atrochryson-Carbonsäure-Synthase (ACAS).^{219,220}

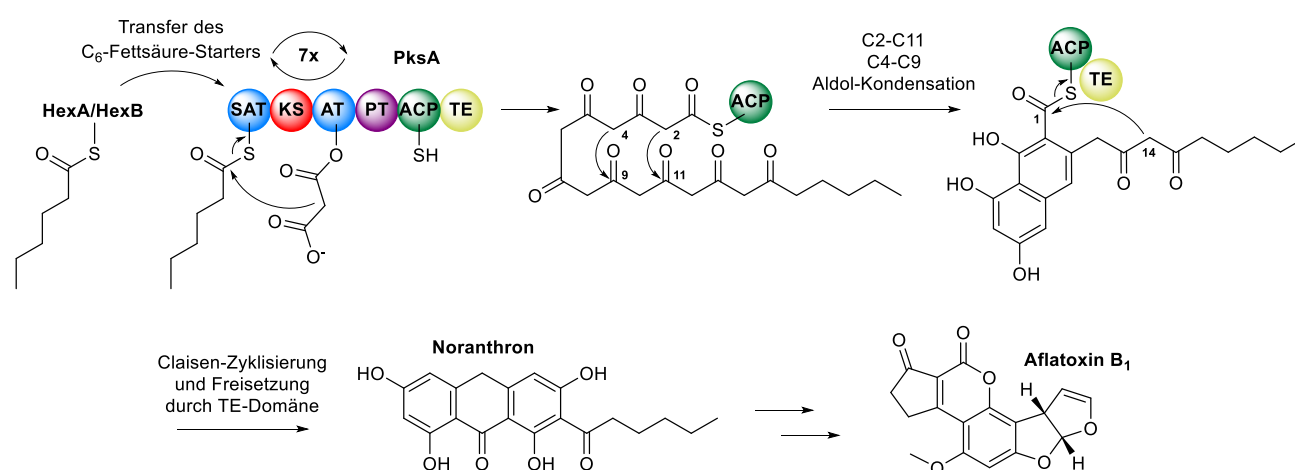


Abbildung 14: PksA als repräsentatives Beispiel für die modulare PKS Norsolorinsäuresynthase

Die Biosynthese von Aflatoxin beginnt mit der Herstellung eines Capronsäurethioesters durch die FAS-Untereinheiten HexA und HexB, welches auf die SAT-Domäne der NR-PKS PksA transferiert wird und die Kondensation mit Malonyl-CoA sieben Mal durchläuft. Die PT-Domäne kontrolliert die korrekte Zyklisierung der reaktiven Polyketidkette. Das gebundene Intermediat wird durch die TE/CLC-Domäne freigesetzt und durch die C₁₄-C₁ Claisen-Zyklisierung entsteht Noranthron, welches von weiteren Enzymen des Pathways zu Aflatoxin B₁ umgesetzt wird.

Im Gegensatz zu PksA besitzen andere NR-PKS statt TE- oder CLC-Domänen eine Reduktase (R)-Domäne, die die NAD(P)H-abhängige Freisetzung des Polyketids *via* einer 2-Elektron-Reduktion als Aldehyd katalysieren, so z.B. CazM in der Chaetoviridinbiosynthese, die 3-Methylorcinaldehydsynthase (MOS) aus *Acremonium strictum* oder AfoE in der Asperfuranonbiosynthese.^{170,215,221} Für die Freisetzung des Polyketids von NR-PKS ohne dedizierte Freisetzungsdomäne ist zumeist eine separate, *trans*-agierende Thioesterase des Metallo- β -Lactamase-Typs verantwortlich, die keine Sequenzhomologie zu den TE-Domänen von NR-PKS aufweist, wie es beispielsweise bei der erwähnten ACAS der Fall ist.²²⁰ In den Fällen methylierter unreduzierter Polyketide ist eine MT-Domäne zwischen der ACP- und der Freisetzungsdomäne lokalisiert. Dafür werden der MT-Domäne während der Polyketidbiosynthese verschiedene β -Keto-Acyl-Intermediate präsentiert, die leicht enolisierbar sind, um einen für den Methyltransfer verfügbaren nukleophilen α -Kohlenstoff zu erzeugen. Die Methylierung erfolgt jedoch oft selektiv und an bestimmten Positionen, wie durch die PksCT in der Citrininbiosynthese demonstriert wird.²²²

1.6.1.3 Iterative Typ I-PKS – Partiiell-reduzierende PKS

Verglichen mit den NR- und HR-PKS bilden PR-PKS die kleinste Gruppe. Die Domänenarchitektur von PR-PKS ist im Gegensatz zu den anderen beiden Subtypen hoch konserviert und weist neben der KS-AT-, ACP- und TE-Domäne noch eine KR-Domäne auf. DH- und ER-Domänen zur weiteren reduktiven Prozessierung hingegen fehlen. PR-PKS katalysieren die Produktion von kleinen, meist aromatischen Molekülen. Beispiele für PR-PKS umfassen die 6-Methylsalicylsäure (6-MSA)-Synthase (6-MSAS; Abbildung 15), welche in Pilzen weit verbreitet ist und auch in einigen Bakterien vorkommt, NcsB und AziB, welche die biosynthetischen Bausteine der Neocarcinostatin und Azinomycinbiosynthese 2-Hydroxy-5-Methyl-Napthoesäure und 5-Methyl-Napthoesäure herstellen und die Melleinsynthase SACE5532.^{223–226} Während der Biosynthese von 6-MSA katalysiert die KR-Domäne der 6-MSAS auf Basis eines Triketids nur eine einzige Reduktion, die nach der Zyklisierung und Dehydrierung des freigesetzten Produkts in dem kleinen aromatischen Molekül resultiert. 6-MSA ist eine biosynthetische Vorstufe des Mykotoxins Patulin, des Bruton's Tyrosin-Kinase-Inhibitors *terreic acid* und des Meroterpenoids Yanuthon B.^{227–229}

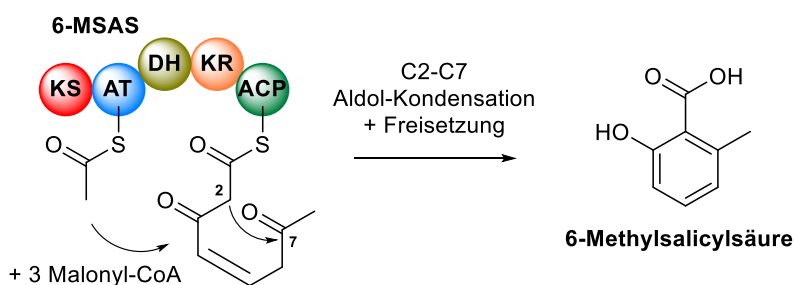


Abbildung 15: Die 6-Methylsalicylsäuresynthase (6-MSAS) als repräsentatives Beispiel für eine PR-PKS

Die 6-MSAS kondensiert ein Acetyl-CoA mit drei Malonyl-CoA. Bei der Freisetzung des Polyketids findet eine Aldol-Kondensation zwischen C2 und C7 statt, wodurch ein aromatischer Ring gebildet wird.

1.6.1.4 Iterative Typ I-PKS – Hoch-reduzierende PKS

HR-PKS ähneln aufgrund ihrer Domänenarchitektur am stärksten FAS aus Säugetieren (FAS Typ I), sie sind große multifunktionale Proteine mit KS-, ACP-, MAT-, KR-, DH- und ER-Domänen und besitzen damit die Kapazität, β -Ketideinheiten bis zur vollständigen Sättigung zu reduzieren. Die ER-Domänen mancher HR-PKS sind allerdings inaktiv, sodass die Enoyl-Reduktion durch *trans*-agierende Hilfs-ER-Enzyme ersetzt werden muss. Dies ist beispielsweise bei der Betaenonbiosynthese der Fall, indem die Funktion der inaktiven ER₀-Domäne der HR-PKS Bet1 durch die separate ER Bet3 übernommen wird.²³⁰ Ein anderes Beispiel für eine *trans*-agierende ER ist LovC, die die Funktion der inaktiven ER₀-Domäne der HR-PKS LovB in der Lovastatinbiosynthese ersetzt (Abbildung 16).²³¹ Viele HR-PKS besitzen auch eine zusätzliche MT-Domäne, die vor der β -Ketoreduktion die α -Position der wachsenden Polyketidkette methyliert. Interessanterweise wurde bei der Strukturaufklärung der FAS von Säugetieren eine rudimentäre, inaktive MT-Domäne an einer analogen Position zu den funktionalen MT-Domänen der HR-PKS entdeckt, was die Verwandtschaft beider Enzymklassen unterstreicht.²³²

Trotz aller Ähnlichkeiten zu Säugetier-FAS (mFAS) unterscheiden sich HR-PKS in Bezug auf die Programmierung ihrer β -Keto-Reduktionsdomänen drastisch. Die KR-, DH- und ER-Domänen der mFAS sind in jedem Zyklus aktiv und produzieren gesättigte Fettsäuren wie Palmitinsäure; im funktionellen Sinne könnten sie daher als HR-PKS angesehen werden.²³³ Die Aktivität der β -Keto-Reduktionsdomänen von HR-PKS hingegen variiert in jeder Iteration in gewissem Maße. Das heißt eine Ketideinheit kann durch Einsatz der KR-, DH- und ER-Domänen vollkommen zu einem Methylen reduziert werden oder die Prozessierung des β -Ketids stoppt nach der Reduktion durch die KR- oder DH-Domäne, was in der Bildung eines β -Alkohols oder eines Enoyl-Thioesters resultiert. Der selektive Gebrauch reduktiver Domänen der HR-PKS generiert funktionelle Gruppen wie Alkohole, Alkene und Alkane, die durch modifizierende Enzyme im weiteren Verlauf der Biosynthese zur Bildung komplexerer Strukturen weiter modifiziert werden. HR-PKS mit MT-Domänen sind aufgrund der katalysierten Methylierungen auch in der Lage verzweigte Polyketide zu produzieren, während mFAS wegen ihrer inaktiven MT-Domäne nur lineare Fettsäuren synthetisieren. Wie für die Lovastatin- und Pseurotin A-Biosynthese bewiesen werden konnte, ist die korrekte α -Methylierung ein wichtiger Kontrollpunkt in der Herstellung des Polyketids und kann bei Mangel der richtigen Methylgruppen zur Bildung von Shuntprodukten führen.^{231,234}

Außer dem unterschiedlichen Vorgehen bei der Reduktion von β -Ketiden unterscheiden sich HR-PKS von mFAS auch noch im Mechanismus der Produktfreisetzung. Nachdem Fettsäuren ihre Ziellänge erreicht haben, werden sie durch Hydrolyse von einer dedizierten TE-Domäne der mFAS freigesetzt.²³⁵ Mit bisher einer einzelnen Ausnahme (PKS28 aus *Moniliophthora roreri*) besitzen die meisten HR-PKS allerdings keine fusionierte TE-Domäne.²³⁶ Stattdessen kommen zur Hydrolyse des Produkts oft *trans*-agierende, separate Thioesterasen zum Einsatz, die im gleichen BGC kodiert werden. Dies konnte z.B. für die HR-PKS LovB beobachtet werden, die ohne gesonderte Thioesterase-Aktivität durch LovG das Produkt Dihydromonacolin L nicht freisetzte (Abbildung 16).^{231,237} Separate Thioesterasen scheinen auch für eine effiziente Bildung des richtigen PKS-Primärprodukts eine wichtige Rolle zu spielen, was durch die Bildung neun verschiedener Hydrolyse-Produkte von Bref-PKS ohne ihre dazugehörige Bref-Thioester-Hydrolase aus der Brefeldin A-Biosynthese demonstriert wurde.²³⁸

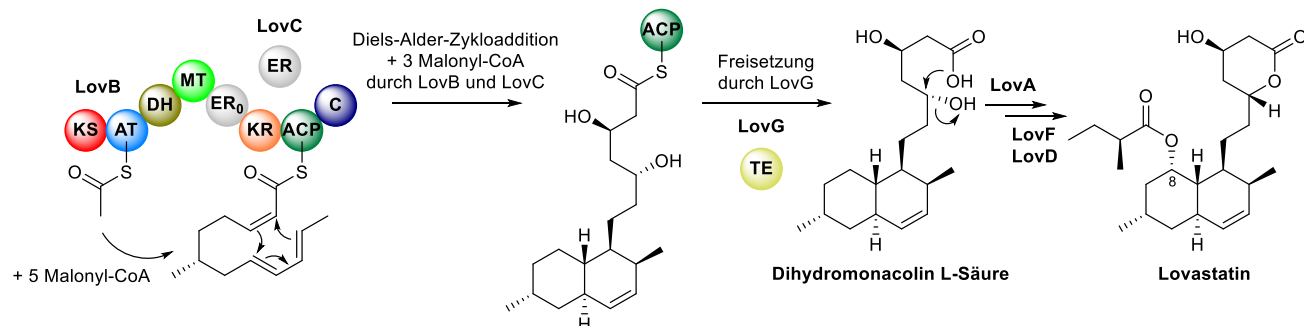


Abbildung 16: Die Lovastatinbiosynthese als repräsentatives Beispiel für einen HR-PKS-Pathway

Die Lovastatinbiosynthese beginnt mit der Kondensation, Reduktion und Methylierung von einem Acetyl-CoA mit fünf Malonyl-CoA durch die HR-PKS LovB. Auf Basis des Hexaketids findet ein Ringschluss über eine Diels-Alder-Zykloaddition statt, bevor das Intermediat um weitere drei Malonyl-CoA erweitert wird. Die ER₀-Domäne von LovG ist inaktiv, ihre Funktion wird deshalb durch die separate ER LovC ersetzt. Die distinkte TE/CLC LovG katalysiert die Freisetzung des Polyketids als Dihydromonacolin L-Säure, die spontan lactonisieren kann. Das Cytochrom P450 LovA dehydrogeniert und hydroxyliert Dihydromonacolin L zu Monacolin L. Die Lovastatin-Diketidsynthase LovF synthetisiert eine α-Methylbutyrylkette, die von der Acyltransferase LovD auf die C8-Hydroxygruppe übertragen wird und so Lovastatin bildet.

Zusätzlich zur Hydrolyse durch eine TE ist die Acyltransferase-vermittelte Übertragung des Polyketids auf ein nucleophiles Atom eines Akzeptormoleküls oder einer anderen Synthase ein weiterer Mechanismus der Produktfreisetzung von HR-PKS.^{239,240} Die Biosynthese von 1,3-Benzendiol-Lactonen (z.B. das Mykotoxin Zearalenon) unterliegt der sequenziellen Weitergabe eines stark reduzierten, linearen Polyketids von einer HR-PKS auf die SAT-Domäne einer NR-PKS, die das Polyketid anschließend um weitere Einheiten erweitert, über Aldol-Kondensation den aromatischen Ring bildet und schließlich sogar noch zur Makrozyklisierung beiträgt.^{241–243}

Eine reduktive Freisetzung eines Polyketids von einer HR-PKS mit einer R-Domäne als Aldehyd ist bisher nur von der zuvor erwähnten Bet1 bekannt.²³⁰ Die in Kapitel 5.1 näher diskutierte PKS VirA scheint allerdings auch ohne dedizierte R-Domäne ihr Produkt durch eine 2-Elektron Reduktion als Aldehyd freisetzen zu können.²⁴⁴

1.6.1.5 Typ II-PKS

Ähnlich zu den bakteriellen Typ II-FAS sind Typ II-PKS Multi-Enzym-Komplexe bestehend aus monofunktionalen Proteinen, von dem jedes durch ein diskretes Gen kodiert wird und untereinander beträchtliche Sequenzkonservierung aufzeigen.^{199,245} Typ II-PKS wurden ausschließlich in Bakterien, vor allem in *Streptomyces* spp., gefunden und produzieren aromatische Polyketide, für die eine lineare Anordnung mehrerer aromatischer Ringe exemplarisch ist.²⁴⁶ Diese aromatischen Polyketide umfassen oft benutzte Antibiotika wie die Tetrazykline oder Actinorhodin, oder Zytostatika wie Doxorubicin (Abbildung 17).^{247–249} Zur Synthese dieser Stoffe wird ein minimaler Satz iterativ eingesetzter Enzyme benötigt. Die typische „minimale PKS“ besteht aus einem Heterodimer zweier KS-Einheiten (KS_α und KS_β) und einem ACP, welches die wachsende Polyketidkette trägt. Die Sequenzen von KS_α und KS_β weisen eine hohe Ähnlichkeit zueinander auf, mit Ausnahme einer Cystein-haltigen katalytischen Region in KS_α, die essenziell zur Claisen-Kondensation beiträgt. Trotz der mutierten katalytischen Region in KS_β ist dieses katalytisch aktiv. Es wurde gezeigt, dass in den PKS für die Produktion von Actinorhodin und Tetracenomycin, das Cystein der katalytischen Region von KS_β zu einem Glutamin mutierte,

welches in das Laden von Malonyl-CoA und der Generierung von Acetyl-KS durch Decarboxylierung von Malonyl-ACP involviert ist.²⁵⁰ Eine weitere sehr wichtige Funktion von KS $_{\beta}$ besteht darin, dass es durch Kontrolle der Anzahl der Claisen-Kondensationsschritte die primäre Determinante für die Länge der Kohlenstoffkette darstellt und deswegen auch als *chain length factor* (CLF) bezeichnet wird.²⁵¹ Der Transfer der Malonyl-Erweiterungseinheit auf das ACP kann in einigen Fällen eine Malonyl-CoA:ACP-Transferase (MCAT) als vierte Komponente erfordern. Wegen der Abwesenheit eines MCAT-Gens in den meisten Typ II-PKS Genclustern wurde allerdings die Hypothese aufgestellt, dass Kapazitäten zur Malonylierung des ACP aus der Fettsäurebiosynthese bereitgestellt werden.^{252,253} Es wurde alternativ auch schon gezeigt, dass das ACP *in vitro* zur Selbst-Malonylierung in der Lage ist, wenn auch nur unter erhöhten Malonyl-CoA Konzentrationen.²⁵⁴ Die Reduktion und das Faltungsmuster des entstehenden Polyketids wird schließlich durch zusätzliche PKS-Untereinheiten, einschließlich Ketoreduktasen, Cyclasen (CYC), Aromatasen (ARO) oder Oxygenasen (Ox) bestimmt (Abbildung 17).²⁴⁶

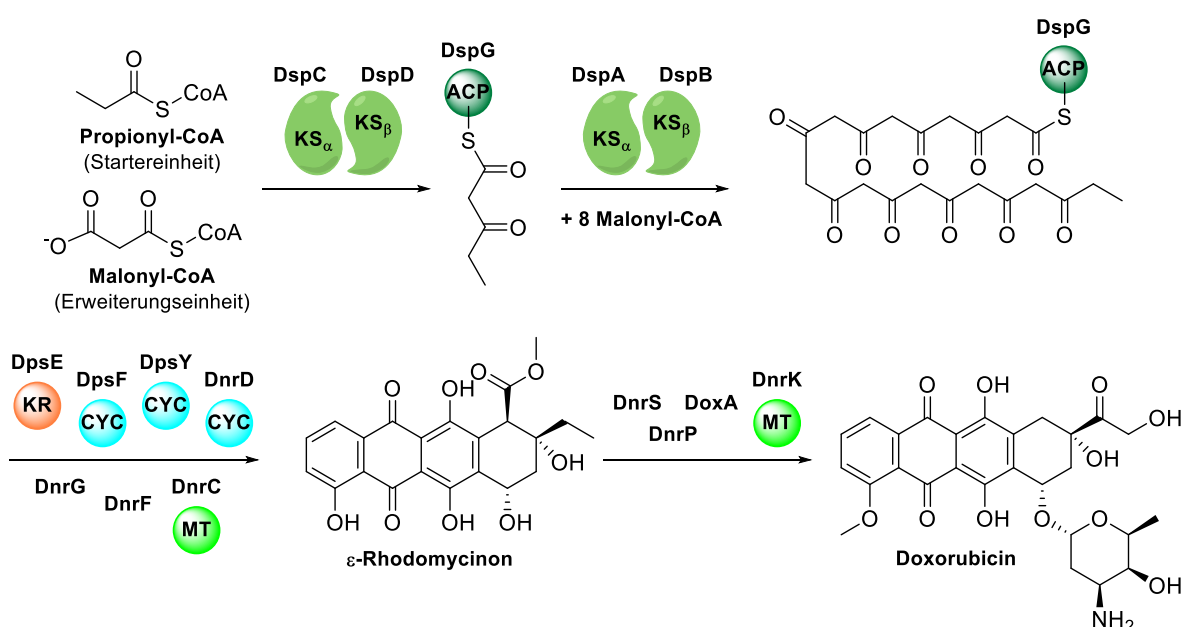


Abbildung 17: Die Doxorubicinbiosynthese als Beispiel für einen Typ II-PKS-Pathway

Die Doxorubicinbiosynthese in *S. peucetius* benötigt ein Propionyl-CoA als Startereinheit und neun Malonyl-CoA als Erweiterungseinheiten. Der Prozess involviert zwei „minimale PKS“ (DpsC-DpsD-DpsG und DpsA-DpsB-DpsG), wobei das ACP DpsG beide heterodimeren KS bedient. Die nächsten Schritte involvieren eine separate Ketoreduktase (DpsE), drei Cyclasen (DpsF, DpsY, DnrD), zwei Oxygenasen (DnrG, DnrF) und eine Methyltransferase (DnrC) um das wichtige Intermediat ε-Rhodomycinon zu produzieren.²⁵⁵ Durch weitere Modifikation mit DnrS, DnrP, DoxA und DnrK entsteht schließlich Doxorubicin.

1.6.1.6 Typ III-PKS

Pflanzliche Stilben- und Chalcon-synthasen (STS/CHS), die Stilbenderivate oder Vorstufen von pflanzlichen Flavonoiden, Isoflavonoiden und Anthocyaninen synthetisieren, waren die ersten identifizierten und gut untersuchten Vertreter der Typ III-PKS (Abbildung 18).²⁵⁶ Bis in die 1990er Jahre wurde geglaubt, dass Typ III-PKS exklusiv in Pflanzen vorkommen, bis sie auch in Bakterien entdeckt wurden.²⁵⁷ Mit der Analyse des *A. oryzae*-Genoms stellte sich heraus, dass auch Pilze Typ III-PKS besitzen, seitdem wurden erst elf pilzliche Typ III-PKS untersucht und charakterisiert.^{258,259}

Verglichen mit den multiplen funktionellen Domänen des Typ I und der multienzym-Organisation von Typ II sind Typ III-PKS simple Homodimere, die aus jeweils zwei ca. 42 kDa großen KS-ähnlichen Enzymen bestehen.²⁶⁰ Diese Proteine sind multifunktionell und katalysieren die iterative Kondensation von Starter Fett-Acyl-CoA und verschiedener Erweiterungseinheiten (meistens Malonyl-CoA) zu einer Polyketidkette mit anschließender intramolekularer Lacton-, Aldol- oder Claisen-Zyklisierung, alles innerhalb einer Tasche des aktiven Zentrums.^{261,262} Typ III-PKS akzeptieren ein breites Spektrum an Starter-Fett-Acyl-CoA-Einheiten, die von kurzen/langen linearen (z.B. Acetyl-CoA, Steraoyl-CoA) über verzweigte (z.B. Isobutyryl-CoA), bis hin zu zyklischen (z.B. *p*-Coumaryl-CoA, Benzoyl-CoA) Molekülen reichen.²⁶² Trotz dieser Promiskuität zeigen sie meistens jedoch eine höhere Affinität gegenüber spezifischer Substrate.^{263–266}

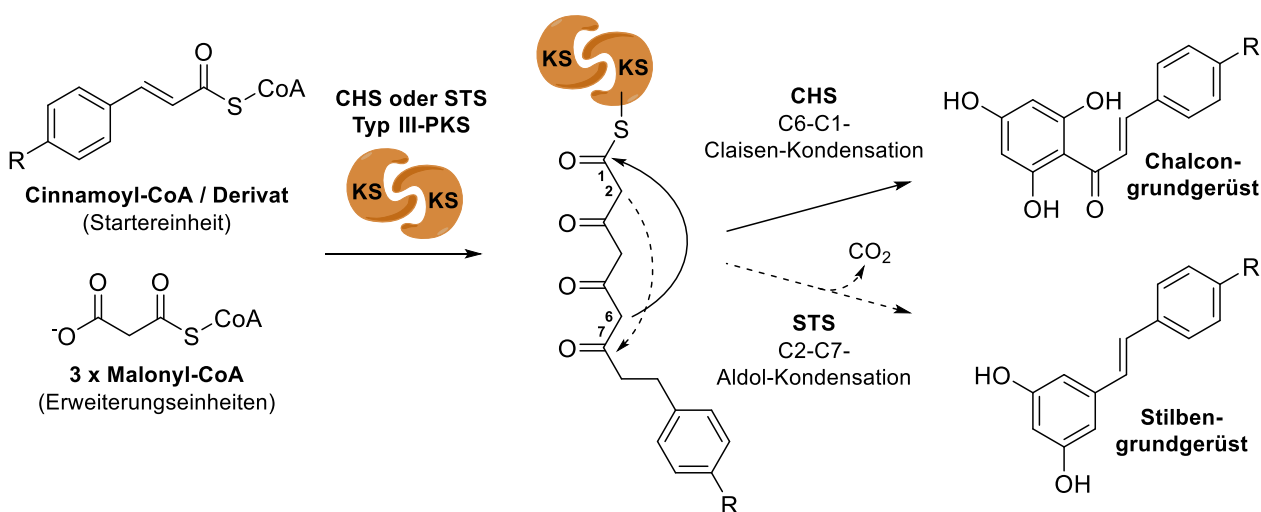


Abbildung 18: Chalcon- bzw. Stilbensynthasen als repräsentatives Beispiel für Typ III-PKS

Die homodimeren Typ III-PKS Chalconsynthase (CHS) und Stilbensynthase (STS) kondensieren Cinnamoyl-CoA oder ein substituiertes Derivat mit drei Malonyl-CoA-Erweiterungseinheiten.²⁶⁷ Die CHS katalysiert anschließend einen C6-C1-Ringschluss über eine Claisen-Reaktion und bildet so die Chalcone. Die STS hingegen zyklisiert das Polyketid über einen C2-C7-Aldol-Mechanismus, was zur Bildung von Stilbenen führt.

1.6.2 Nicht-ribosomale Peptide und nicht-ribosomale Peptidsynthetasen

Neben den Polyketiden stellen die nicht-ribosomalen Peptide (NRP) eine der wichtigsten Naturstoffklassen dar. Das Grundgerüst der NRP wird wie Polyketide von multifunktionellen bzw. multimodularen Enzymen, den Nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), hergestellt. Diese Enzyme sind in der Lage, unabhängig von Ribosomen Monomere über Peptidbindungen zu verknüpfen. Die Spanne der durch NRPS verknüpften Bausteine reicht von den 20 proteinogenen L-Aminosäuren über ihre D-Stereoisomere, sowie nicht-proteinogenen Amino-, α -Hydroxy- und α -Keto-, bis hin zu Fettsäuren und umfasst über 500 bisher dokumentierte Moleküle.²⁶⁸ Diese strukturelle Vielfalt an Monomeren in Verbindungen mit Modifikationen durch verschiedene NRPS-inherente Domänen sorgt für ein breites Spektrum linearer und einfacher bzw. verzweigter zyklischer Substanzen mit vielen interessanten biologischen Aktivitäten (Abbildung 19A). NRP unterscheiden sich in ihrer Komplexität, die einfache zyklische Dipeptide mit einem 2,5-Diketopiperazinrückgrat (z.B. die Indolalkaloide der Echinulin-Familie oder die tremorgenen Fumitremorgine), große zyklische Peptide (z.B. das Immunsuppressivum Ciclosporin A) oder verzweigte zyklische Peptide (z.B. das Antibiotikum Bacitracin) miteinschließt.^{269–272} Lineare NRP können von Tripeptiden (z.B. das Herbizid Bialaphos) bis zu 20-mer Peptiden (z.B. das Antibiotikum Alamethicin) reichen.^{273,274} Das bisher größte bekannte NRP ist Syringopeptin 25 A mit 25 verknüpften Monomeren.²⁷⁵

Die hauptsächlichen Produzenten von NRP sind Bakterien, vor allem die Phyla Actinobacteria, Firmicutes und die Klassen α -, β -, γ -Proteobakterien. Mittlerweile werden aber auch in Cyanobakterien und δ -Proteobakterien immer mehr NRP entdeckt. Pilzliche NRP stammen hauptsächlich aus Ascomyceten. NRPS aus höheren Organismen, wie die NRPS Ebony aus der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) oder die PKS-NRPS-hybride Nemamidsynthetase aus dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, bilden eher die Ausnahme.^{276–278} Die natürlichen biologischen Funktionen von vielen NRP im Ursprungsorganismus sind immer noch Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion.^{279,280} Die NRP von nicht-pathogenen Bakterien, wie verschiedene Actinomyceten, haben wahrscheinlich eine Kommunikations- oder Signalisierungsfunktion. Eine große und strukturell diverse Gruppe innerhalb der NRP, produziert von Bakterien und Pilzen, sind die Siderophore. Unter Eisenmangel werden diese Stoffe aus der Zelle exportiert und als ihre Fe^{III} -Komplexe wieder reimportiert, um die Versorgung mit Eisen zur Aufrechterhaltung zellulärer Prozesse zu gewährleisten. Siderophore sind allerdings auch wichtige Faktoren in der Virulenz vieler pathogener Pilze, aber vor allem Gram-negativer Bakterien.²⁸¹ Zwei prominente Beispiele für Siderophore sind Enterobactin aus *E. coli* und Bacillibactin aus *Bacillus anthracis*.^{282,283} Viele NRP sind für den Menschen auch aus pharmazeutischer Hinsicht interessant. Die viel genutzten β -Lactam-Antibiotika, wie die Penicilline oder Cephalosporine, Immunsuppressiva, wie Ciclosporin A oder auch das Zytostatikum Bleomycin A lassen sich auf die Bildung durch NRPS oder NRPS-PKS-Hybride zurückführen.^{271,284–286}

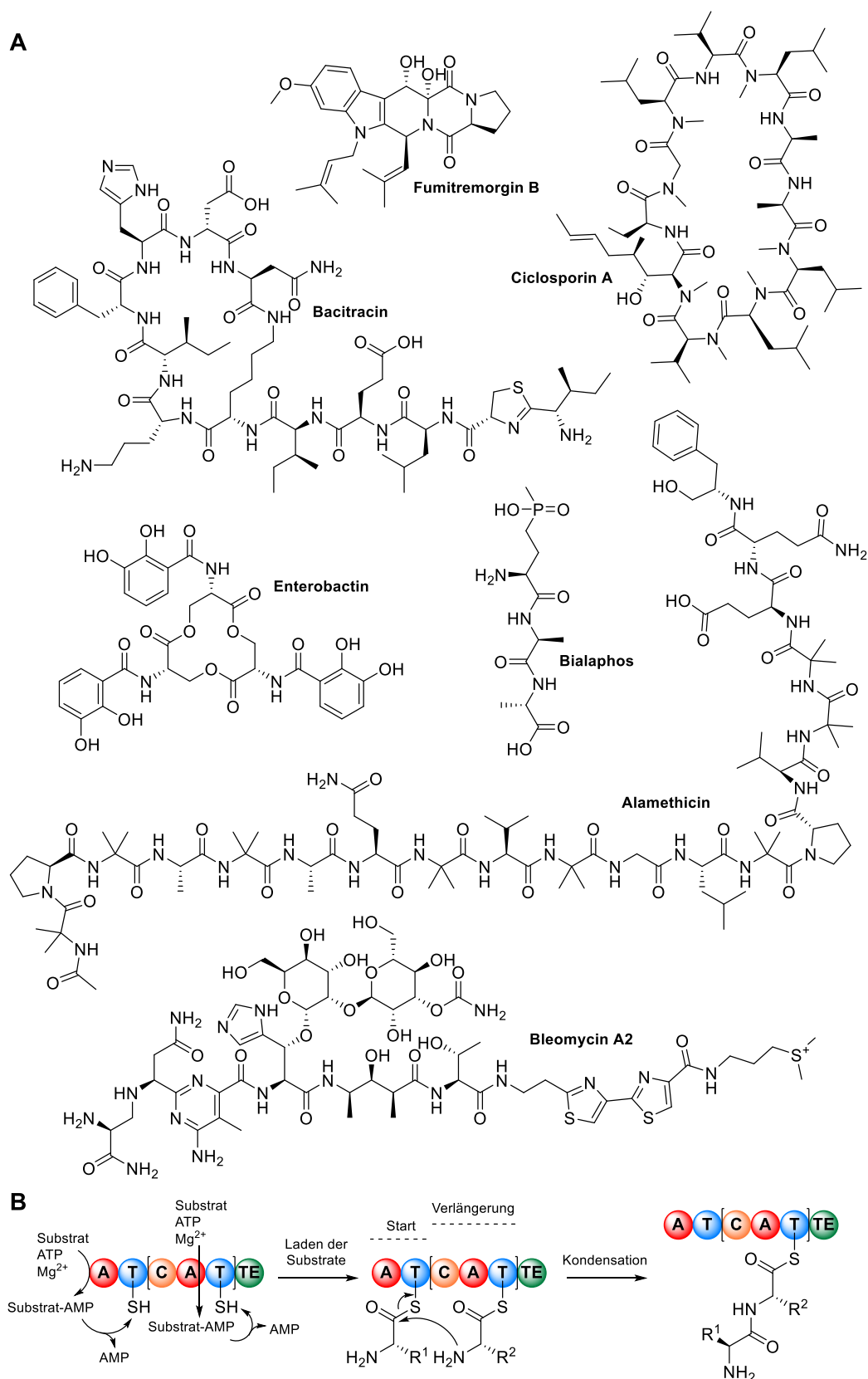


Abbildung 19: Beispiele verschiedener nicht-ribosomaler Peptide und genereller Mechanismus von NRPS

NRPS weisen eine hohe strukturelle Diversität auf (A). Der generelle Mechanismus von NRPS involviert die Erkennung und Aktivierung von Substraten durch die A-Domäne, gefolgt von der Bindung an die T-Domäne, bevor sie durch die C-Domäne über eine Peptidbindung kondensiert werden (B). Es folgt die Freisetzung durch die TE-Domäne.

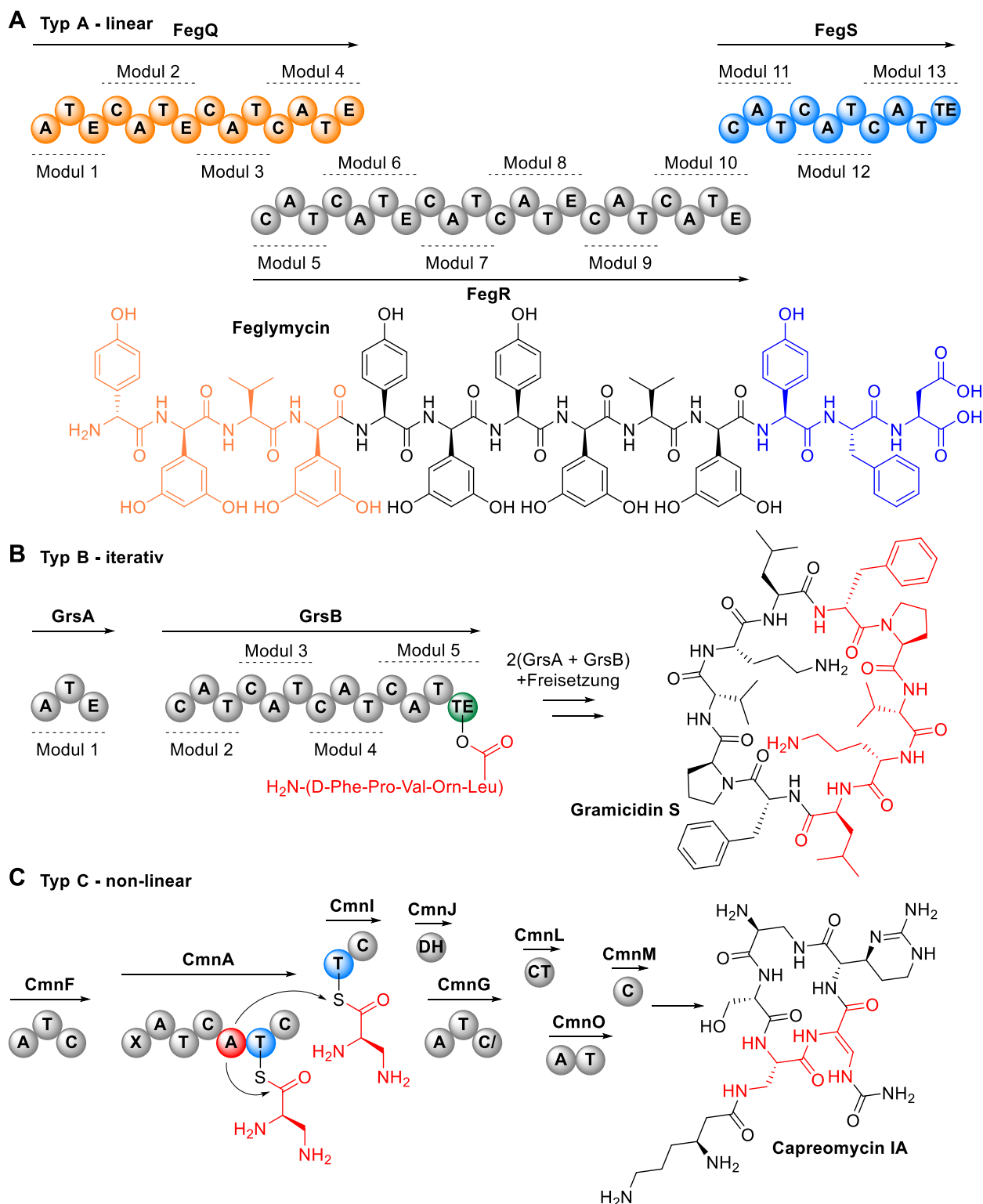


Abbildung 20: Beispiele für verschiedene NRPS-Typen

Die lineare NRPS FegQRS synthetisiert das Tridecamer Feglymycin fließbandartig (A). Die iterative NRPS GrsAB benutzt alle Module zweifach und speichert das Produktintermediat des ersten Reaktionsdurchgangs (rot) an der TE-Domäne (grün), bis zur Kondensation mit dem Intermediat der 2. Runde und der Freisetzung durch Makrozyklisierung (B). Die non-lineare NRPS für die Capreomycinbiosynthese ist auf mehrere Proteine verteilt (C). Die zweite A-Domäne von CmnA (rot) aktiviert zwei Moleküle L-2,3-Diaminopropionat (L-Dap) und belädt zwei distinkte T-Domänen (blau): die terminale T-Domäne von CmnA und die T-Domäne von CmnI. Das resultiert in der Wiederholung von L-Dap im finalen Produkt (rot). X repräsentiert eine unbekannte Domäne, C/ eine modifizierte C-Domäne und CT eine Carbamoyltransferase.

Das typische Modul einer NRPS besteht aus der Adenylierungs (A)-Domäne, welche für die Erkennung, die ATP-abhängige Aktivierung und Übertragung eines Substrats auf die prosthetische Phosphopantheinylgruppe der Thiolierungs (T)-Domäne (auch *peptidyl carrier protein* (PCP) genannt). Das gebundene Substrat wird durch den Phosphopantheinylarm zur Kondensierungs (C)-Domäne gebracht, wo es über eine Peptidbindung mit der, an das PCP des vorherigen Moduls gebundenen, wachsenden Peptidkette verbunden wird (Abbildung 19B). Während das Peptid am PCP gebunden ist, kann es von diesem zu weiteren optionalen Modul-inherenten Proteindomänen, wie Epimerisierungs (E)-, Formylierungs (F)-, Methylierungs (M)-, Heterozyklisierungs (Cy)-, Reduktions (R)- oder Oxidations (Ox)-Domänen gebracht und von diesen modifiziert werden. Alternativ werden zusätzliche Modifikationen am PCP-gebundenen Peptid durch *trans*-agierende modifizierende Enzyme durchgeführt. Zuletzt wird das reife Oligopeptid von einer TE-Domäne freigesetzt und in vielen Fällen auch zyklisiert.

Wie auch PKS können NRPS anhand ihres Aufbaus und der Abfolge der von ihnen durchgeführten Reaktionen in drei Klassen unterteilt werden. Typ A beinhaltet lineare NRPS, d.h. jedes Modul wird vom N-Terminus ausgehend nur einmalig benutzt, bis das kondensierte Produkt am C-Terminus des letzten Moduls freigesetzt wird. Wie bei modularen Typ I-PKS führt das zu einer Kollinearität zwischen den vorhandenen Modulen und den kondensierten Substraten, sodass aus dem Aufbau der NRPS eine Ableitung des Produkts erfolgen könnte. Hier wird durch die fließbandartige Abfolge der Reaktionen von einer *assembly line* gesprochen. Beispiele für Produkte von linearen NRPS sind das Antibiotikum Vancomycin aus *Amycolatopsis* und das tridecamere Feglymycin aus *Streptomyces* sp. DSM 11171 (Abbildung 20A).^{287,288} Der Typ B wird von iterativen NRPS gebildet, die während eines biosynthetischen Zyklus bestimmte Module mehrfach benutzen, sodass in den entstehenden Peptiden gleiche Einheiten mehrfach verbaut werden, wie es z.B. in der Biosynthese des Siderophors Enterobactin oder des Antibiotikums Gramicidin S geschieht (Abbildung 20B).^{289–291} Eine weitere Variation des iterativen Mechanismus wird von Typ C-NRPS ausgeübt. In einer non-linearen Manier werden dabei einzelne Domänen (keine ganzen Module) mehrfach verwendet, wodurch eine Vorhersage des Produkts unmöglich ist. Auf diese Art und Weise werden z.B. die Antibiotika Capreomycin und Viomycin synthetisiert (Abbildung 20C).^{292,293}

1.6.3 Isoprenoide, prenylierte Substanzen und Prenyltransferasen

1.6.3.1 Isoprenoide, ihr Ursprung und *trans*-/*cis*-Prenyltransferasen

Isoprenoide, darunter Terpene und Terpenoide, sind eine große Gruppe von Naturstoffen mit hoher struktureller Diversität und verschiedenen biologischen Funktionen. Mit über 80.000 bekannten Vertretern bildet diese Klasse etwa ein Drittel der charakterisierten Substanzen in der *Dictionary of Natural Products* (<http://dnp.chemnetbase.com>).²⁹⁴ Viele isoprenbasierte Substanzen übernehmen als Primärmetabolite wichtige physiologische Funktionen in diversen Organismen. Diese wichtigen Moleküle reichen von Ubichinon oder Menachinon (Elektronenüberträger in der Elektronentransportkette aus Pro- und Eukaryoten), über photosynthetische Pigmente (Phytol in Chlorophyll und Carotenoid-Pigmente wie Retinal), Sterole (eine Mehrheit davon ist verantwortlich für Membranstabilität), von Cholesterin abgewandelte Steroid-Hormone, Gibberelline (pfl. Wachstumshormone), Undecaprenyldiphosphat (UPP; dient als membrangebundener Überträger von Glycan bei der bakteriellen Zellwandsynthese) bis hin zu Dolicholen (spielen eine Rolle bei der cotranslationalen Modifikation von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum).^{295–299} Die posttranslationale Modifikation von Proteinen, wie GTPasen der RAS-Familie oder heterotrimere G-Proteine, durch Anhängen von Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Isoprenoiden ist essenziell für ihre korrekte zelluläre Funktion.³⁰⁰ Neben diesen Beispielen für lebenswichtige Aufgaben sind viele Isoprenoide selbst oder als funktionelle Gruppen von Indolalkaloiden, Coumarinen, Xanthonen, Chinonen und Naphtalenen im Sekundärmetabolismus zu verorten.³⁰¹ Der erhöhte lipophile Charakter prenylierter Substanzen steigert in vielen Fällen deren biologische Aktivität gegenüber ihren unprenylierten Pendants (z.B. durch leichtere Membrangängigkeit).³⁰² Des Weiteren bieten Prenylgruppen zusätzliche Angriffspunkte für die weitere strukturelle Modifikation der Substanz durch Hydroxylierung, Zyklisierung oder Acetylierung.³⁰¹ Die Übertragung von Isopreneinheiten auf Akzeptormoleküle wird von Prenyltransferasen (PTs) verschiedener Typen katalysiert (Abbildung 21).

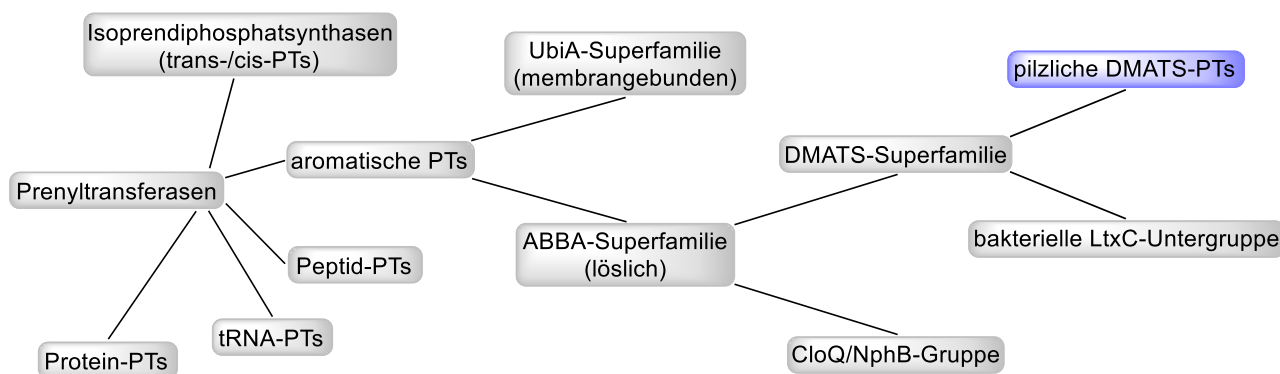


Abbildung 21: Einteilung verschiedener Prenyltransferasen

Prenyltransferasen werden je nach Herkunft, Akzeptormolekül oder strukturellen Merkmalen kategorisiert. Die pilzlichen DMATS-PTs haben für diese Arbeit die größte Bedeutung.

Die Basis für den Aufbau isoprenbasierter Substanzen oder funktioneller Gruppen sind zwei lineare C₅-Prenyldiphosphat-Moleküle: Isopentenylidiphosphat (IPP) und sein Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Beide Substanzen werden von zwei verschiedenen Stoffwechselwegen gebildet: dem

Mevalonatweg (MVA) oder dem Methylerythritolphosphatweg (MEP) (Abbildung 22A). Der Mevalonatweg findet hauptsächlich im Cytosol von Tieren, Pflanzen, Pilzen und Archaeen statt, allerdings schien ein horizontaler Gentransfer von einem eukaryotischen oder archaeeellen Donor dazu geführt zu haben, dass auch einige Bakterien ihre Isopreneinheiten auf diese Art synthetisieren.³⁰³ Der MEP-Weg ist aus dem Großteil der Bakterien, allen Cyanobakterien und Chloroplasten in Pflanzen bekannt.³⁰⁴

Auf Basis dieser C5-Isopreneinheiten können Prenyltransferasen (hier im speziellen Isoprendiphosphatsynthasen) Kopf-zu-Schwanz-Kondensationen von IPP mit DMAPP katalysieren, um so verschiedene Isoprendiphosphate mit unterschiedlicher Kettenlänge ($n \times C_5$), wie beispielsweise Geranyldiphosphat ($n = 2$; GPP), Farnesyldiphosphat ($n = 3$; FPP), Geranylgeranyldiphosphat ($n = 4$; GGPP), Geranylfarnesyldiphosphat ($n = 5$; GFPP) oder längeren Molekülen zu generieren (Abbildung 22A).³⁰⁵ Unter Berücksichtigung der Stereochemie der gebildeten Doppelbindung (*E/Z*) können diese Isoprendiphosphatsynthasen in *trans*- und *cis*-PTs unterteilt werden.

Die typischerweise Homodimeren *trans*-PTs katalysieren die Bildung von Produkten mit kurzer oder mittlerer Kettenlänge, die von 10 bis 50 Kohlenstoffatomen reicht. Jedes Monomer weist in seiner aktiven Region zwei konservierte aspartatreiche DDXDD-Motive auf, die insgesamt drei Mg^{2+} -Ionen koordinieren, welche für die Diphosphat-Arretierung der allylischen Substrate verantwortlich sind.³⁰⁶ Im Beispiel der Octaprenyldiphosphatsynthase (OPPS) attackiert C4 von IPP in der aktiven Region eines Monomers das C1 von FPP in der aktiven Seite des anderen Monomers nukleophil und bildet durch konsekutive Kopf-zu-Schwanz-Kondensationen mit vier weiteren Molekülen IPP Octaprenyldiphosphat mit 40 Kohlenstoffatomen (Abbildung 22B).³⁰⁷ Dieses Polymer bildet die wichtige Prenylseitenkette von Ubichinon (oder Menachinon).³⁰⁸ Andere bekannte Beispiele für *trans*-PTs wie die Farnesyldiphosphatsynthase (FPPS) und die Geranylgeranyldiphosphatsynthase (GGPPS) synthetisieren FPP oder GPP mit jeweils 15 bzw. 20 Kohlenstoffatomen (Abbildung 22A).^{309,310} Im Gegensatz zu den *trans*-PTs enthalten *cis*-PTs kein aspartatreiches Motiv und katalysieren die Bildung von langkettigen Produkten mit ≥ 55 Kohlenstoffatomen bis hin zu natürlichem Gummi mit über 10.000 kondensierten Isopren-Einheiten.³⁰⁵ Die Undecaprenyldiphosphatsynthase (UPPS) ist ein prominentes Beispiel für *cis*-PTs und katalysiert die Kopf-zu-Schwanz-Kondensation von 8 Molekülen IPP auf ein Molekül FPP, um die C55-Kette von Undecaprenyldiphosphat zu bilden (Abbildung 22B).³¹¹ Trotz ihrer ähnlichen Reaktionsmechanismen und der Verwendung von Mg^{2+} unterscheiden sich *trans*- und *cis*-PTs sowohl in ihrer Primär- als auch Tertiärstruktur.

Die C₅ – C₂₀-Prenyldiphosphate DMAPP, IPP, GPP, FPP und GGPP können von einer großen Familie strukturell ähnlicher Enzyme, den Terpensynthasen/-zyklasen, zur Bildung der Grundgerüste von Hemi- (C₅), Mono- (C₁₀), Sesqui- (C₁₅), Di- (C₂₀), Ses- (C₂₅), Tri- (C₃₀), Tetra- (C₄₀) und längeren Polyterpenen benutzt werden.³¹² Die Terpengrundgerüste werden oft von verschiedenen modifizierenden Enzymen, wie Cytochrom P450 Enzymen, Dehydrogenasen, Methyltransferasen, Acyltransferasen oder Glycosyltransferasen weiter diversifiziert.^{313,314}

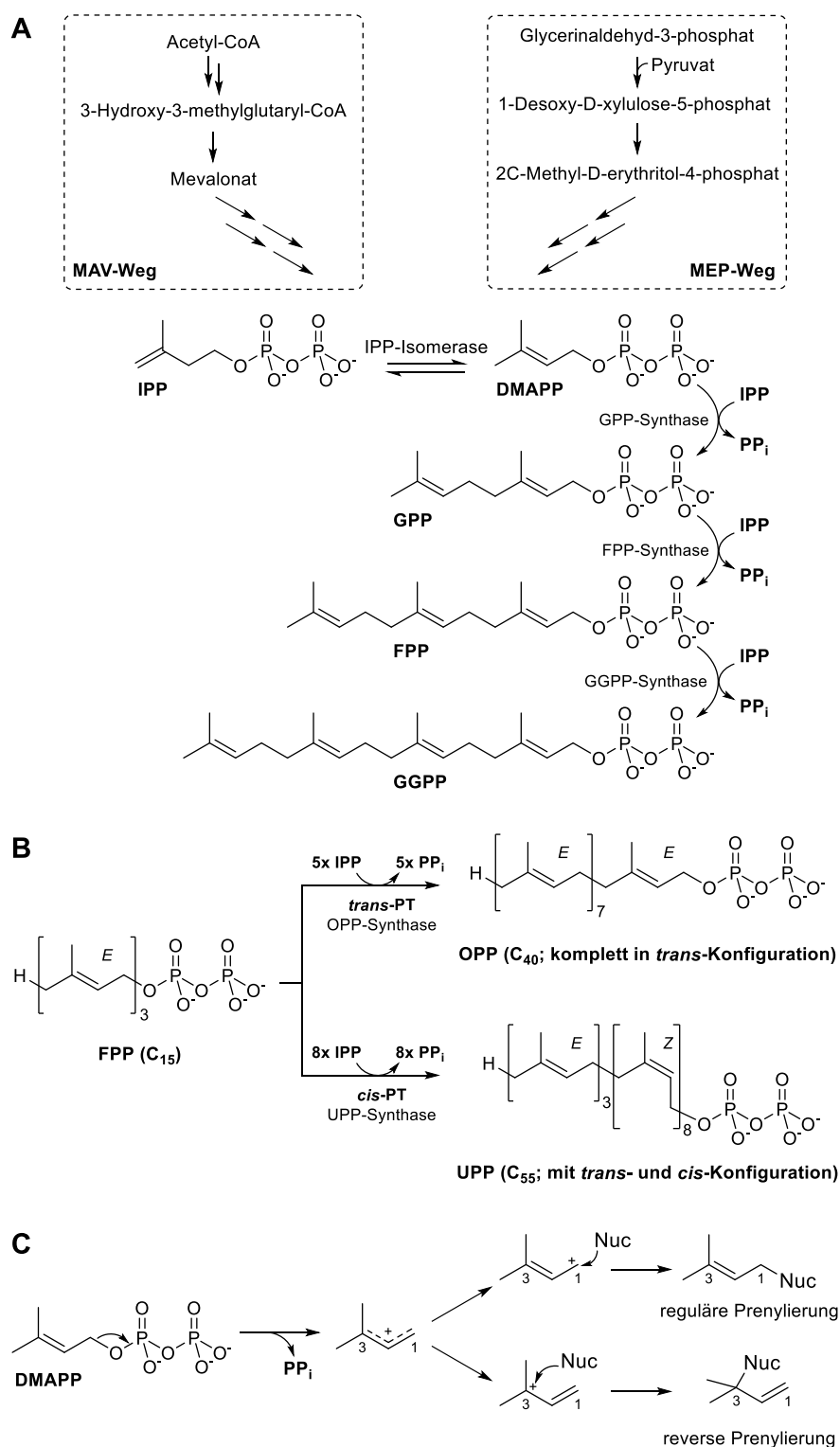


Abbildung 22: Biosynthese von Isoprendiphosphaten verschiedener Länge, Beispiele für *trans*-/*cis*-PTs und schematische Darstellung einer regulären oder reversen Prenylierung mit DMAPP

Die C₅-Grundbausteine von isoprenoidbasierten Substanzen und funktioneller Gruppen, Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), stammen entweder aus dem Mevalonatweg (MAV) oder dem Methylerythritolphosphatweg (MEP). Isoprendiphosphatsynthasen kondensieren DMAPP konsekutiv mit IPP, um Isoprendiphosphate verschiedener Kettenlängen zu erzeugen (A). Die von der OPP-Synthase und der UPP-Synthase katalysierten Reaktionen sind Beispiele für *trans*- und *cis*-PTs (B; modifiziert nach Winkelblech et al., 2015).³⁰¹ Das nukleophile Akzeptormolekül (Nuc) greift das resonanzstabilisierte Dimethylallyl-Carbokation entweder an C1 oder an C3 an, was in einer regulären oder reversen Prenylierung des Nukleophils resultiert (C). Der Modus der Prenylierung ist von der jeweiligen PT abhängig.

1.6.3.2 Membran-gebundene aromatische Prenyltransferasen – UbiA-PTs

Neben der Herstellung von Isoprendiphosphaten katalysieren Prenyltransferasen die reguläre oder reverse Übertragung von Isopreneinheiten auf eine Vielzahl verschiedener Substrate (Abbildung 22C). Eine besondere Gruppe dabei sind die aromatischen PTs, die Prenylgruppen auf C-, N- oder O-Atome aromatischer Akzeptormoleküle wie Phenole, Phenolsäuren, Flavonoide, Coumarine, Naphthalene, Phenazine und Indolderivate übertragen können und damit eine wichtige Rolle in der Diversifikation von Sekundärmetaboliten in Bakterien, Pilzen und Pflanzen spielen.³⁰¹ Basierend auf ihrer Lokalisierung, der Abhängigkeit von bestimmten Metallionen und ihrem strukturellen Aufbau bzw. konservierten Motiven lassen sich aromatische PTs in weitere Gruppen einteilen. Danach gibt es die membranassoziierte UbiA-Superfamilie und die Superfamilie der zytosolischen ABBA-PTs, welche die NphB/CloQ-Untergruppe und die DMATS-PTs mit einschließt (Abbildung 21).³⁰¹

Die integralen Membranproteine des UbiA-Typs katalysieren Schlüsselschritte in der Biosynthese von Ubichinon, Menachinon, Chlorophyll, Häm und Tocopherol. Die UbiA-Überfamilie umfasst u.a. UbiA und MenA zur Ubichinon- und Menachinonbiosynthese aus Bakterien und Archaeen, ihre jeweiligen Homologe COQ2 und UBIAD1 aus Eukaryoten, sowie Chlorophyllsynthasen und Homogentisat-PTs aus photosynthetischen Organismen.^{315–318} Wie die *trans*-Isoprendiphosphatsynthasen besitzen membrangebundene UbiA-PTs konservierte aspartatreiche (NDXX)DXXXD Motive für die Koordination des Prenyl-Donor-Diphosphats über Mg^{2+} -Ionen.³¹⁵ Als Prototyp der Überfamilie katalysiert UbiA die Kondensation einer Isoprenylkette an die *meta*-Position von 4-Hydroxybenzoat (Abbildung 23).^{319,320} Dabei spaltet es das Diphosphat vom Prenyl-Donor (in *E. coli* z.B. vom zuvor erwähnten Octaprenyldiphosphat) und generiert ein Carbokationintermediat am Ende der Isoprenylkette, welches mit der *meta*-Position des aromatischen Substrats reagiert, um eine C–C-Bindung zu bilden. Trotz seiner Regiospezifität akzeptiert UbiA Isoprenylketten variabler Länge und kann so in verschiedenen Spezies die Ubichinone Coenzym Q₆₋₁₀ (CoQ₆₋₁₀) generieren.³²¹ Die genannten UbiA-Typ PTs haben eine elementare Bedeutung für den Primärmetabolismus, es gibt jedoch auch viele Vertreter, die eine wichtige Rolle in der Prenylierung von Sekundärmetaboliten spielen. Die membrangebundene Farnesyltransferase AuaA katalysiert beispielsweise die Prenylierung von 2-Methyl-4-Hydroxychinolin während der Aurachinbiosynthese in *Stigmatella aurantiaca*, während die UbiA-ähnlichen PTs AscA und StbC in der Ascofuranon- und LL-Z1272 β -Biosynthese aus *Acremonium egyptiacum* und *Stachybotris bisbyi* Orsellinsäure farnesylieren.^{322–324}

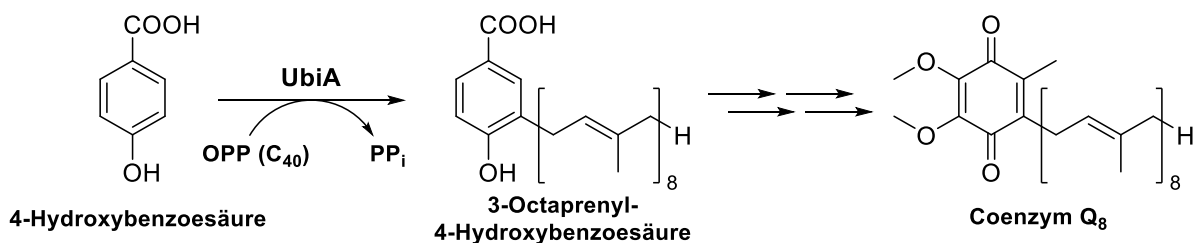


Abbildung 23: Prenyltransfer durch UbiA aus *E. coli* während der Coenzym Q₈ (CoQ₈)-Biosynthese

1.6.3.3 Lösliche aromatische Prenyltransferasen – ABBA-PTs

Die löslichen bakteriellen und pilzlichen Prenyltransferasen unterscheiden sich strukturell deutlich von membrangebundenen UbiA-ähnlichen PTs. Die durch PTs katalysierte Friedel-Crafts-Alkylierung eines Aromaten involviert die Abspaltung des Diphosphats vom Prenyldonor. Dabei muss das entstehende reaktive allylische Kation gegen die wässrige Umgebung abgeschirmt werden. Während spekuliert wird, dass in membrangebundenen PTs eine tiefe lipophile Tasche, umgeben von Transmembranhelices, diese Aufgabe übernehmen könnte, ist es sicher, dass lösliche Prenyltransferasen dies durch eine Fassähnliche Struktur aus β -Faltblättern gewährleisten.^{325,326} Die erste Kristallstruktur einer löslichen PT war die der in die Naphterpinbiosynthese involvierten Naphtalen-Geranyltransferase NphB aus *Streptomyces* sp. CL190. Sie weist eine 10-strängige antiparallele β -Fassfaltung auf, die aus fünf repetitiven $\alpha\beta\alpha$ -Elementen besteht.³²⁷ Die β -Faltblätter bilden einen inneren Zylinder, der außen von α -Helices abgeschirmt wird (Abbildung 24A). Ihre katalytische Region befindet sich in der Mitte dieses Zylinders und besitzt verglichen mit den zuvor diskutierten Membran-gebundenen PTs kein aspartatreiches (N/D)DXXD Metallionen-Bindemotiv. Trotzdem ist die von ihm katalysierte Geranylierung von 1,6-Dihydroxynaphtalen oder Flaviolin abhängig von Mg^{2+} -Ionen (Abbildung 24B).³²⁷ Die strukturelle Architektur aus fassbildenden $\alpha\beta\alpha$ (ABBA)-Elementen scheinen alle löslichen Prenyltransferasen, inklusive der DMATS-PTs, gemeinsam zu haben, daher werden diese PTs dem ABBA-Typ zugerechnet. Zwei Jahre vor NphB wurde der erste Vertreter dieser Enzymklasse, CloQ, aus *Streptomyces roseochromogenes* identifiziert. CloQ katalysiert die Prenylierung von 4-Hydroxyphe-nylpyruvat in der Biosynthese von Clorobiocin.³²⁸ Nach diesen beiden Enzymen ist die CloQ/NphB-Untergruppe der Prenyltransferasen benannt. Es stellte sich allerdings heraus, dass NphB innerhalb der ABBA-PTs eine Ausnahme bildet: andere lösliche Prenyltransferasen des ABBA-Typs wie CloQ, sein Ortholog NovQ aus *Streptomyces spheroides* und alle DMATS-PTs unterscheiden sich deutlich von NphB in ihrer Aminosäuresequenz und besitzen keine konservierten aspartatreichen Metallbindemotive, zeigen aber dennoch signifikante aromatische PT-Aktivität.^{329,330} Das aktive Zentrum von CloQ weist dafür fünf positiv-geladene Aminosäuren auf, die das Diphosphat des Prenyldonors koordinieren, bei seiner Abspaltung helfen und durch ihre elektropositive Natur das elektronegative Intermediat so stabilisieren, sodass die notwendige Katalyseenergie für die elektrophile aromatische Substitution herabgesetzt wird.³³⁰ Es konnte gezeigt werden, dass PTs der CloQ/NphB-Untergruppe eine hohe Promiskuität gegenüber verschiedener aromatischer Substrate aufweisen.^{327,329–331}

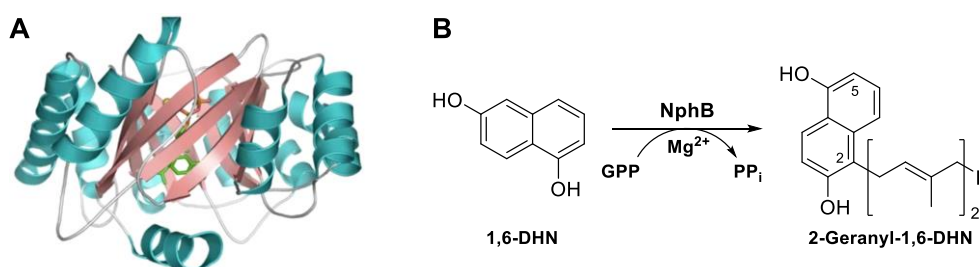


Abbildung 24: 3D-Struktur von NphB und die von NphB katalysierte Reaktion

Die 3D-Struktur von NphB zeigt das klassische Faltungsmuster aus antiparallelen $\alpha\beta\alpha$ -Elementen (A; entnommen aus Kuzuyama, 2017).³³² Der innere Zylinder aus β -Faltblättern (rosa) enthält das aktive Zentrum und wird von α -Helices (türkis) umgeben. Die Mg^{2+} -abhängige Geranylierung von 1,6-Dihydroxynaphtalen (1,6-DHN) durch NphB erfolgt wie dargestellt an Position C2 (B) oder in zehnfach geringerem Maße auch an Position C5.³²⁷

1.6.3.4 Lösliche aromatische Prenyltransferasen – DMATS-PTs

Mit über 60 identifizierten Enzymen und Kristallstrukturen von bekannten Vertretern wie AtaPT, FgaPT2, CdpNPT oder FtmPT1 bilden die löslichen Enzyme aus der Familie der Dimethylallyltryptophansynthasen (DMATS) die am besten untersuchte Gruppe der Prenyltransferasen.^{301,325,333–335} Im Gegensatz zu ABBA-PTs katalysieren die hauptsächlich aus Ascomyceten bekannten DMATS-PTs die Übertragung von Isopreneinheiten überwiegend auf Indole oder Indolderivate, inklusive tryptophanhaltiger zyklischer Dipeptide, Indolterpenoide und Tryptophan selbst.^{301,336} DMATS-PTs, sowie die PTs der CloQ/NphB-Untergruppe besitzen keine aspartatreichen Motive und katalysieren den Transfer von Prenylgruppen unabhängig von Metallionen. Trotzdem scheint die Anwesenheit von divalenten Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} einen positiven Einfluss auf die Aktivität einiger DMATS-PTs auszuüben.^{337–339} Wie zuvor erwähnt, weist die Tertiärstruktur der DMATS-PTs, wie die der CloQ/NphB-Untergruppe, ebenfalls die antiparallele β -Fassfaltung mit einem hydrophoben Kern auf. Diese strukturelle Analogie ist bemerkenswert, besonders da auf Sequenzebene kaum Ähnlichkeit zwischen beiden Enzymklassen besteht.³³³ Für die Sekundärstruktur eines Proteins steht allerdings nur eine begrenzte Anzahl von energetisch bevorzugten Strukturlösungen zur Verfügung, deswegen verläuft die Entwicklung von Proteinfaltungsmustern oft konvergent.³⁴⁰ Im Vergleich dazu ist die Variabilität auf Sequenzebene quasi unerschöpflich, sodass viele Sequenzen mit einem bestimmten Faltungsmuster kompatibel sein können. Die Notwendigkeit, das nach der Abspaltung des Diphosphats bei der Friedel-Crafts-Alkylierung entstehende Dimethylallyl-Carbokation gegen einen nukleophilen Angriff durch Wasser abzusichern, resultierte scheinbar in der Evolution von analogen Strukturen der verschiedenen Gruppen löslicher PTs. Die Abspaltung von Diphosphat vom Prenyldonor wird von den Bedingungen im aktiven Zentrum begünstigt und resultiert in der Erzeugung des erwähnten Dimethylallyl-Carbokations. Dieses attackiert anschließend das aromatische Akzeptormolekül elektrophil und bildet dabei einen σ -Komplex (auch als Wheland-Komplex oder Arenium-Ion bekannt), der durch Verlust der Aromatizität und der sp^3 -Hybridisierung des vom Carbokation attackierten Kohlenstoffatoms charakterisiert wird. Die Abgabe eines Protons stellt die Aromatizität wieder her und beendet den katalytischen Zyklus.³⁴¹ Durch die Resonanzstabilisierung des geladenen Prenylintermediaten kann der elektrophile Angriff am Akzeptormolekül entweder durch das C1- oder das C3-Atom des Dimethylallyl-Carbokations erfolgen, was jeweils in einer regulären oder einer reversen Prenylierung resultiert (Abbildung 22C).^{330,336} Wie auch die PTs der CloQ/NphB-Untergruppe offenbaren DMATS-PTs *in vitro* eine hohe Promiskuität gegenüber einer Vielzahl aromatischer Substrate.³⁴² Während die überwiegende Mehrheit beim Umsatz ihrer natürlichen Substrate eine hohe Regioselektivität aufweisen, verläuft die Prenylierung unnatürlicher Substrate in Bezug auf ihre Position deutlich unspezifischer.^{343–345}

Der erste untersuchte Vertreter der DMATS-PTs war die Tryptophan C4-PT DmaW aus der Ergotalkaloidbiosynthese in *Claviceps fusiformis*, die eine Dimethylallylgruppe auf C4 des Indolrings von Tryptophan überträgt.³⁴⁶ Seit der Entdeckung ihres Orthologs FgaPT2 (Abbildung 25A) aus der Fumigaclavinbiosynthese in *A. fumigatus* im Jahre 2005 war diese Enzymklasse Bestandteil zahlreicher Studien, sodass mittlerweile DMATS identifiziert wurden, die jede Position des Indolrings von Tryptophan (N1, C2, C3, C4, C5, C6, C7) regiospezifisch prenylieren können.^{301,347}

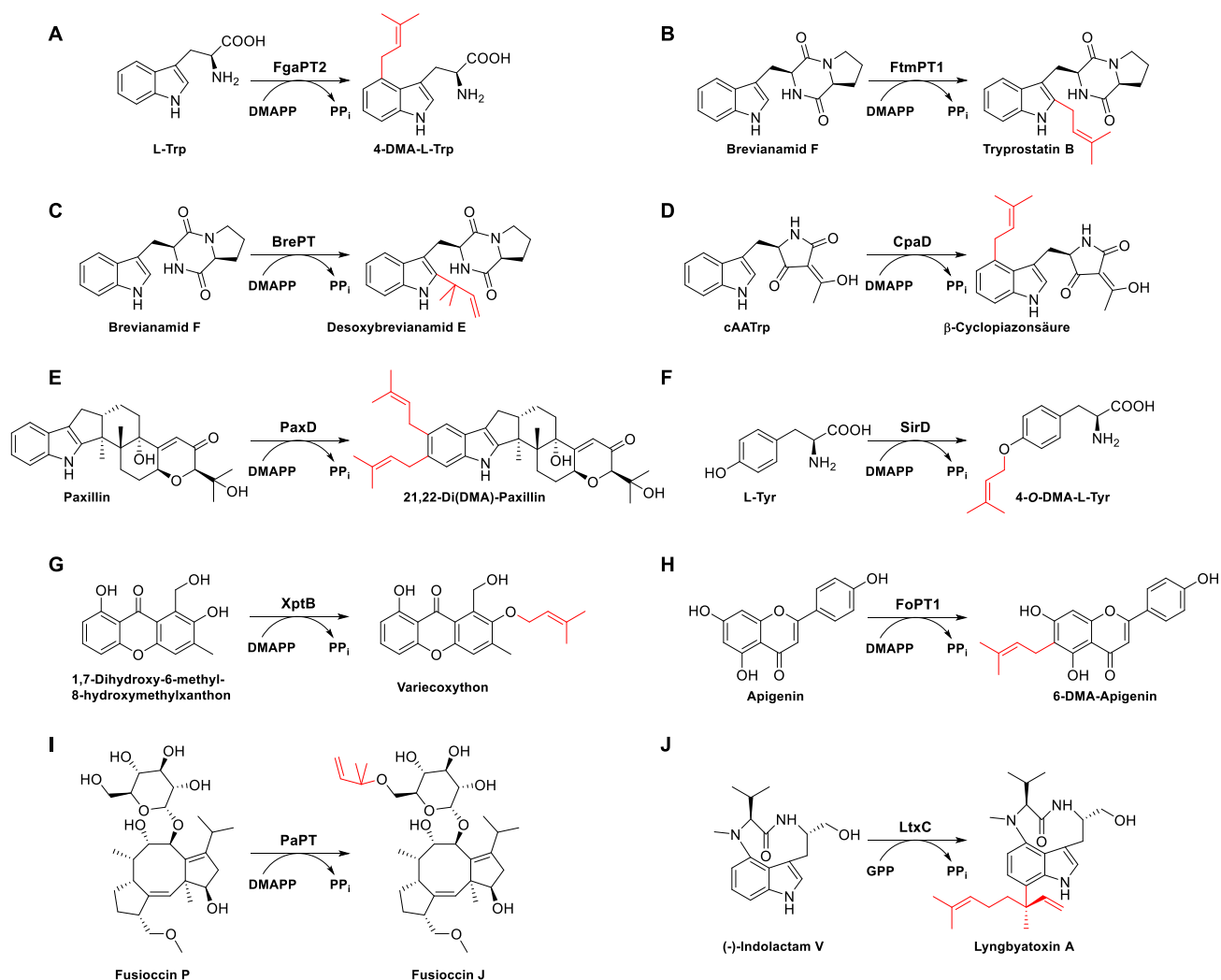


Abbildung 25: Beispiele für von DMATS-PTs katalysierte Reaktionen

Die zahlreichsten Mitglieder der DMATS-Superfamilie, katalysieren die regiospezifische Prenylierung von indolhaltigen zyklischen Dipeptiden. Die Prenylierung erfolgt meistens an den Positionen N1, C2, C3 und C7. FtmPT1 war die erste untersuchte zyklisches-Dipeptid-DMATS-PT und katalysiert eine C2-Prenylierung von Brevianamid F (cyclo-L-Trp-L-Pro) während der Biosynthese von Fumitremorginen bzw. Verruculogen in *A. fumigatus* (Abbildung 25B).³⁴⁸ Später wurde gezeigt, dass FtmPT1 auch die reguläre Prenylierung von Brevianamid F an C3, mit einhergehender Zyklisierung des Indolnukleus und des Diketopiperazinrings vornehmen kann.³⁴⁹ Strukturelle und mechanistische Untersuchungen von FtmPT1 legen nahe, dass zunächst eine C3-Prenylierung stattfindet, bevor eine intramolekulare Umlagerung in der Positionierung des Prenylrests an C2 resultiert.³³⁶ Die reverse Prenylierung von zyklischen Dipeptiden an C2 ist von mehreren Enzymen bekannt: NotF aus einer *Aspergillus* sp. und BrePT aus *A. versicolor* (Abbildung 25C) vermitteln beide die Übertragung eines Dimethylallyls an C2 von cyclo-L-Trp-L-Pro, während die CdpC2PT aus *Neosartorya fischeri* an cyclo-L-Trp-L-Trp und EchPT1 aus *A. ruber* an cyclo-L-Trp-L-Ala die gleichen Prenylierungen vornehmen.^{118,350–352} Die aus *A. oryzae* bekannte cTrpPT überträgt einen Dimethylallylrest sowohl auf N1, als auch auf C7 von cyclo-L-Trp-L-Trp.³⁵³ CpaD aus der Biosynthese von α -Cyclopiazonsäure in *A. flavus* und *A. oryzae* katalysiert den Transfer einer Prenylgruppe auf C4 von cyclo-L-Acetoacetyl-L-Trp (cAATrp) (Abbildung 25D).³⁵⁴

EchPT2 aus *A. ruber* prenyliert Preechinulin konsekutiv sowohl an C5, als auch an C7, kann aber auch C4- und C6-Prenylierungen vornehmen.¹¹⁸

Wie zuvor erwähnt, prenylieren DMATS-PTs auch Indolterpenoide oder andere aromatische Verbindungen. FgaPT1 aus *A. fumigatus* katalysiert im Vergleich zu FgaPT2 beispielsweise einen späteren Schritt in der Ergotalkaloidbiosynthese, indem es Fumigaclavin A an C2 revers prenyliert.³⁵⁵ PaxD aus *P. paxilli* katalysiert die sukzessive Diprenylierung von Paxillin an C21 und C22 (Abbildung 25E), während AtmD aus *A. flavus* am selben Substrat reverse Prenylgruppen an C20 und C21 installieren kann.³⁵⁶ Zwei Mitglieder der DMATS-Superfamilie, SirD aus *Leptosphaeria maculans* (Abbildung 25F) und TyrPT aus *A. niger*, benutzen Tyrosin als Substrat und übertragen einen Dimethylallylrest auf seine *p*-Hydroxygruppe, können aber auch Tryptophan an C7 prenylieren.^{357,358} Auch Xanthone (XptB aus *A. nidulans*) oder Flavonoide (FoPT1 aus *Fusarium oxysporum*) werden durch Vertreter der DMATS-Superfamilie prenyliert (Abbildung 25G und H).^{337,359} Die besonders ungewöhnliche DMATS-PT PAPT aus *Phomopsis amygdali* transferiert einen reversen Dimethylallylrest auf die 6-Hydroxygruppe des Glukoserests am Diterpenglykosid Fusicoccin P (Abbildung 25I).³⁶⁰

Während die überwiegende Mehrheit der DMATS-PTs eine Dimethylallylgruppe überträgt gibt es auch einige Exemplare, die GPP, FPP oder mehrere Prenyldonoren verwenden.^{361,362} VrtC aus *P. aethiopicum* akzeptiert beispielsweise nur GPP als Prenyldonor, um eine Vorstufe von Viridicatumtoxin zu prenylieren.³⁶³ Die AtaPT aus *A. terreus* hingegen akzeptiert nicht nur verschiedene Prenyldonoren (C₅ – C₂₀: DMAPP, GPP, FPP, GGPP und Phytyldiphosphat), sondern zeigt auch eine hohe Promiskuität gegenüber aromatischer Akzeptormoleküle.³³⁵

Aufgrund ihrer Herkunft werden bakterielle PTs der LtxC-Untergruppe manchmal von pilzlichen DMATS-PTs separiert, doch aufgrund ihrer strukturellen Analogie werden diese Enzyme öfter als Teil der DMATS-Superfamilie angesehen. Diese bakteriellen Prenyltransferasen besitzen, wie DMATS-PTs und CloQ/NphB-PTs, kein aspartatreiches Motiv und katalysieren die Übertragung von Prenylgruppen unabhängig von divalenten Kationen. Der namensgebende Vertreter LtxC aus der Biosynthese von Lyngbiatoxin im Cyanobakterium *Lyngbia majuscula* geranyliert (–)-Indolactam V in reverser Manier (Abbildung 25J).³⁶⁴ Sein Homolog TleC katalysiert die gleiche Reaktion in der Biosynthese von Teleocidin B in *Streptomyces blastmyceticus*.³⁶⁵

1.6.4 Pilzliche Cytochrom P450 Enzyme (CYPs)

1.6.4.1 Verbreitung und Diversität von CYPs

Cytochrom P450 Enzyme (CYPs) sind Häm-Thiolat-Proteine (benannt nach der Lage der Soret-Bande, $\lambda = 450$ nm, in Komplex mit Kohlenstoffmonoxid), die weit verteilt über alle Domänen des Lebens vorkommen. Die Spanne der Organismen mit CYPs umfasst Menschen (besitzt 57 CYP-Gene), andere Tiere, Pflanzen, Protisten, Pilze, Bakterien und Archaeen.^{366,367} Gene für CYPs konnten sogar in den Riesenviren Mimiviridae, Pandoraviridae und anderen Familien der Ordnung Megavirales nachgewiesen werden.³⁶⁸ Bis 2018 wurden schon über 300.000 einzelne Gene für CYP-Enzyme aus der Fülle an Genomsequenzdaten identifiziert.³⁶⁹ Die in Pilzen entdeckten CYPs wurden in ca. 400 CYP-Familien

(CYP51 – CYP69, CYP501 – CYP699 und CYP5001 – CYP6999) klassifiziert und sind damit den CYP-Familien aus anderen Königreichen zahlenmäßig weit überlegen.^{370,371} Die außergewöhnliche funktionelle und evolutionäre Diversität von Cytochrom P450 Enzymen erschwert die Kategorisierung pilzlicher CYPs allerdings erheblich. Die Klassifikation von CYPs erfolgt für gewöhnlich anhand der Ähnlichkeiten zwischen ihren Aminosäuresequenzen, was bedeutet, dass Sequenzen mit einer Ähnlichkeit >40 % einer CYP-Familie und Sequenzen mit >55 % Ähnlichkeit einer Unterfamilie zugeordnet werden.³⁷² Trotz ihrer breiten Diversität und hohen Sequenzvariabilität besitzen pilzliche CYPs neben ihren konservierten Tertiärstrukturen und enzymatischen Funktionen vier eindeutig erkennbare Motive, die die Identifikation von CYPs aus pilzlichen Genomdaten erleichtern: (1) FXXGXRXCXG, die Häm-bindende Domäne, die den invarianten Cysteinrest als Ligand des Häms mit einschließt; (2 und 3) die Motive EXXR und PER bilden die E-R-R-Triade, welche die Position und Stabilität der Häm-Bindetasche aufrecht erhält; und (4) AGXDTT, das Motiv für die Bindung und Aktivierung von molekularem Sauerstoff.^{373,374}

CYPs sind für die Mehrheit der Organismen essenziell, da sie in hohem Maße sowohl in anabolistische als auch katabolistische Prozesse involviert sind. Sie sind am Aufbau diverser endogener, biologisch relevanter Substanzen, wie Sterole und verschiedener Sekundärmetabolite beteiligt, während eine weitere essenzielle Aufgabe von CYPs darin besteht, den Abbau oder die Detoxifizierung von xenobiotischen Substanzen zu vermitteln.^{375–378} Die Mehrheit der oxidativen Reaktionen in der menschlichen Steroid-Biosynthese werden beispielsweise durch CYPs katalysiert, während CYPs sogar über 70 % der am menschlichen Fremdstoffwechsel beteiligten Enzyme ausmachen (über 80 % der derzeit benutzten Arzneimittel und Umweltchemikalien stellen exogene Substrate für CYPs dar).^{379,380}

Generell gehören CYPs den Monooxygenasen an, da die meisten Vertreter ein einzelnes, von O₂ stammendes, Sauerstoffatom an ihre Substrate binden und somit hydroxylierte oder epoxydierte Produkte generieren. Die Summenformel der generellen Hydroxylierung lautet $R-H + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow R-OH + H_2O$. Außer dieser gewöhnlichen Hydroxylierungsreaktion wurden schon viele CYPs identifiziert, die ungewöhnliche Reaktionen katalysieren. Dazu zählen z.B. die Ausbildung oder Spaltung von C–C-, C–S- oder C–N-Bindungen, Ringschlüsse, -erweiterungen, -kontraktionen, intramolekulare und intermolekulare aromatische Kondensation oder noch komplexere Reaktionen, die die ursprünglichen Strukturen der Substrate dramatisch umformen.³⁸¹

1.6.4.2 Klassifizierung pilzlicher CYPs nach Redoxpartner

Die katalytischen Systeme von mikrobiellen CYPs benötigen Redoxpartner, um zur Spaltung von O₂ zwei Elektronen von NADPH auf das Häm-Eisen im aktiven Zentrum des Enzyms zu übertragen.³⁸² Neben der Zusammenfassung zu Familien basierend auf Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz können CYP-Systeme, basierend auf der Topologie der Proteinkomponenten, in zehn verschiedene Klassen eingeteilt werden, wovon pilzliche CYP-Systeme in die Klassen II, VIII und IX fallen (Abbildung 26). Die meisten pilzlichen CYPs entsprechen der Klasse II und katalysieren eine Vielzahl an Reaktionen im Primärmetabolismus, Sekundärmetabolismus und im Abbau von Xenobiotika.³⁷² Pilzliche Klasse II-CYPs erhalten ihre Reduktionsäquivalente über ein einziges Flavoprotein. Die N-terminale Domäne dieser NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (CPR) enthält ein FMN, während die FAD- und NADPH-

bindenden Domänen C-terminal lokalisiert sind. NADPH transferiert ein Elektronenpaar in Form eines Hydridions (H^-) auf das FAD, welches die Elektronen nacheinander einzeln erst auf FMN und anschließend auf das Häm-Eisen des CYP überträgt, um den katalytischen Zyklus des Häms zu versorgen (Abbildung 27). In einigen Fällen stammt das zweite Elektron von NADH, welches über ein drittes Protein, das Cytochrom b_5 (Cyt b_5), auf das Häm übertragen wird. Selten kann die CYP direkt durch Cyt b_5 und der NADH-abhängigen Cyt b_5 -Reduktase in Abwesenheit einer CPR aktiviert werden, wie z.B. die CYP5150A2 aus *Phanerochaete chrysosporium* (hydroxyliert 4-Propylbenzoesäure).³⁸³ CYPs der Klasse VIII sind Fusionsproteine, deren N-terminale Häm-Domäne über einen kurzen Proteinlinker mit dem C-Terminus einer CPR verbunden sind. Dies ist beispielsweise von P450foxy aus *Fusarium oxysporum* bekannt, welche die Positionen ω -1 bis ω -3 von Fettsäuren hydroxyliert. Diese katalytisch autarke CYP ähnelt damit der bakteriellen P450BM3 aus *Bacillus megaterium*, welche eine vergleichbare Reaktion katalysiert.³⁸⁴ Klasse IX besteht nur aus einem einzigen Mitglied, der P450nor, ebenfalls bekannt aus *F. oxysporum*. Aufgrund seiner einzigartigen strukturellen Merkmale benötigt dieses Enzym keinen Redoxpartner: eine stark lysin- und argininhaltige distale Domäne kann durch ihren positiven Charakter NAD(P)H selbst anziehen und binden, wobei die Spezifität gegenüber NADH oder NADPH von der B'-Helix bestimmt wird. Die Weiterleitung der Elektronen durch das Protein zum Häm wird wahrscheinlich durch eine Häm-nahe Anionenbindestelle begünstigt.³⁸⁵ P450nor katalysiert die Reduktion von zwei Molekülen NO zu einem N_2O und ist damit essenziell für die Denitrifikation in Pilzen.

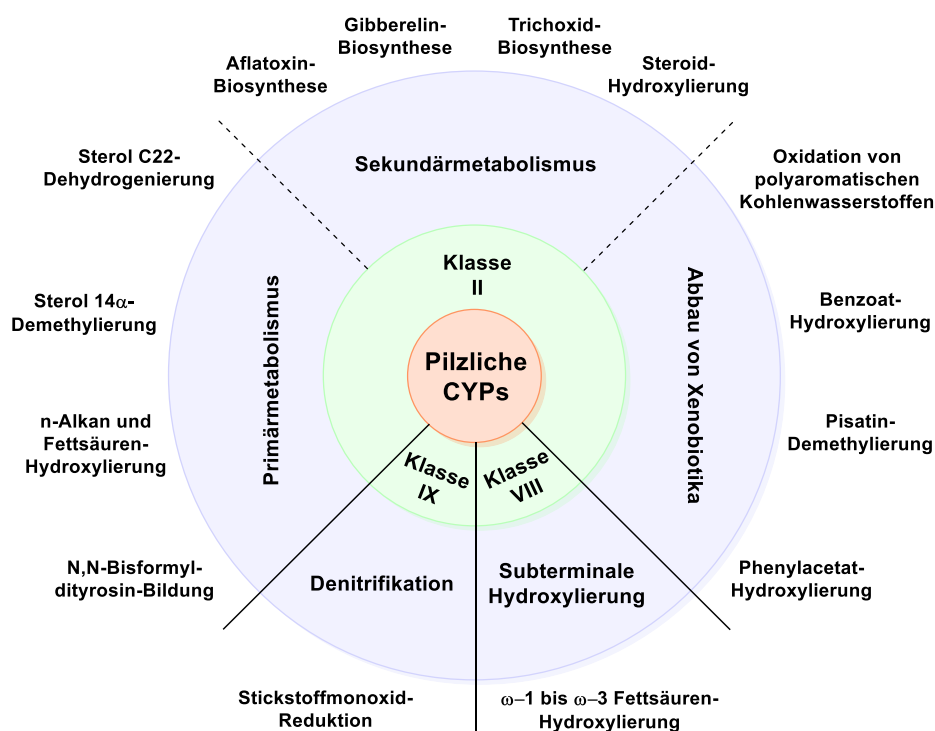


Abbildung 26: Funktionelle Diversifikation und Klassifizierung von pilzlichen CYPs

Die schematische Darstellung der funktionellen Diversifikation und Klassifizierung pilzlicher CYPs (modifiziert nach ³⁷²) zeigt jeweils nur wenige Beispiele für Prozesse des Primär- bzw. Sekundärmetabolismus und des Abbaus von Xenobiotika in die CYPs der Klasse II involviert sind.

Von bakteriellen CYP-Systemen unterscheiden sich die pilzlichen in mehreren Aspekten. Die meisten bakteriellen CYPs verwenden eine Kombination aus einem eisen- und schwefelhaltigen Ferredoxin und einer FAD-abhängigen Ferredoxinreduktase als Redoxpartner, während pilzliche Systeme eine einzelne CPR zur Versorgung des CYPs mit Reduktionsäquivalenten benutzen. Außerdem besteht das bakterielle 3-Komponentensystem aus löslichen zytosolischen Proteinen, wohingegen die meisten pilzlichen CYPs und CPRs membrangebunden vorliegen.^{382,385} Interessanterweise ist die oben erwähnte P450nor die einzige bisher entdeckte lösliche CYP aus Pilzen.

1.6.4.3 Katalytischer Zyklus der CYP-Reaktionen

Die typische Monooxygenase-Reaktion von CYPs verläuft über einen „*oxygen-rebound*“-Mechanismus (Abbildung 27).^{386,387} Der Zyklus beginnt im Ruhezustand (a) mit der Koordination eines Wassermoleküls am Häm-Eisen, was in der Bildung eines *low-spin*-Komplexes resultiert. Diese Koordination wird durch das konservierte Cystein des aktiven Zentrums und den vier Stickstoffatomen des Porphyrinrings (Por) unterstützt. Durch Binden des Substrats (R-H) im aktiven Zentrum wird das Wassermolekül gelöst und das Häm-Fe^{III} wechselt in einen *high-spin*-Zustand (b). Dieses reaktive Häm-Fe^{III} initiiert den Transfer des ersten Elektrons von NADPH über die CPR auf das CYP und wird somit zu Fe^{II} reduziert (c). Ein Molekül O₂ bindet anschließend am Fe^{II} und bildet damit ein Häm-Fe^{II}-O=O-Addukt (d). Das zweite Elektron von NADPH wird über die CPR auf das CYP transferiert und reduziert dieses Addukt zu dem Peroxo-Intermediat Häm-Fe^{III}-O-O⁻ (e). Die Protonierung dieses Intermediats generiert den reaktiven Hydroperoxy-Komplex Häm-Fe^{III}-O-OH (herkömmlich auch als *Compound 0* (Cpd0) bezeichnet; f). Die O-O-Bindung wird durch eine zweite Protonierung unter Freisetzung eines Wassermoleküls heterolytisch gespalten und bildet damit ein energiereiches Porphyrin π -Kationradikal Por^{•+}-Fe^{IV}=O (CpdI; g). Dieses hochreaktive Intermediat abstrahiert ein Wasserstoffatom (H[•]) vom im aktiven Zentrum gebundenen Substrat und wird damit zu der Fe^{IV}-Hydroxospezies Häm-Fe^{IV}-OH (CpdII), während das Substrat nun als Radikal (R[•]) vorliegt (h). Während der typischen Hydroxylierungsreaktion bindet das Hydroxyl-Radikal [HO[•]] am Substratradikal R[•] über einen Häm-Fe^{III}-ROH Komplex (i), was nach Freisetzung des hydroxylierten Produkts und Rekoordination eines Wassermoleküls am Häm-Eisen in der Wiederherstellung des Ruhezustands (a) resultiert. Alternativ ist es den meisten CYPs auch möglich in einem „*Shunt*“-Oxidations-Mechanismus, durch Benutzung von H₂O₂ als Sauerstoff- und Elektronendonator, vom *high-spin* Zustand des Häm-Fe^{III} (b) zum reaktiven Hydroperoxy-Komplex Häm-Fe^{III}-O-OH (f) zu wechseln, ohne NADPH oder molekularen Sauerstoff zu verwenden.^{387,388}

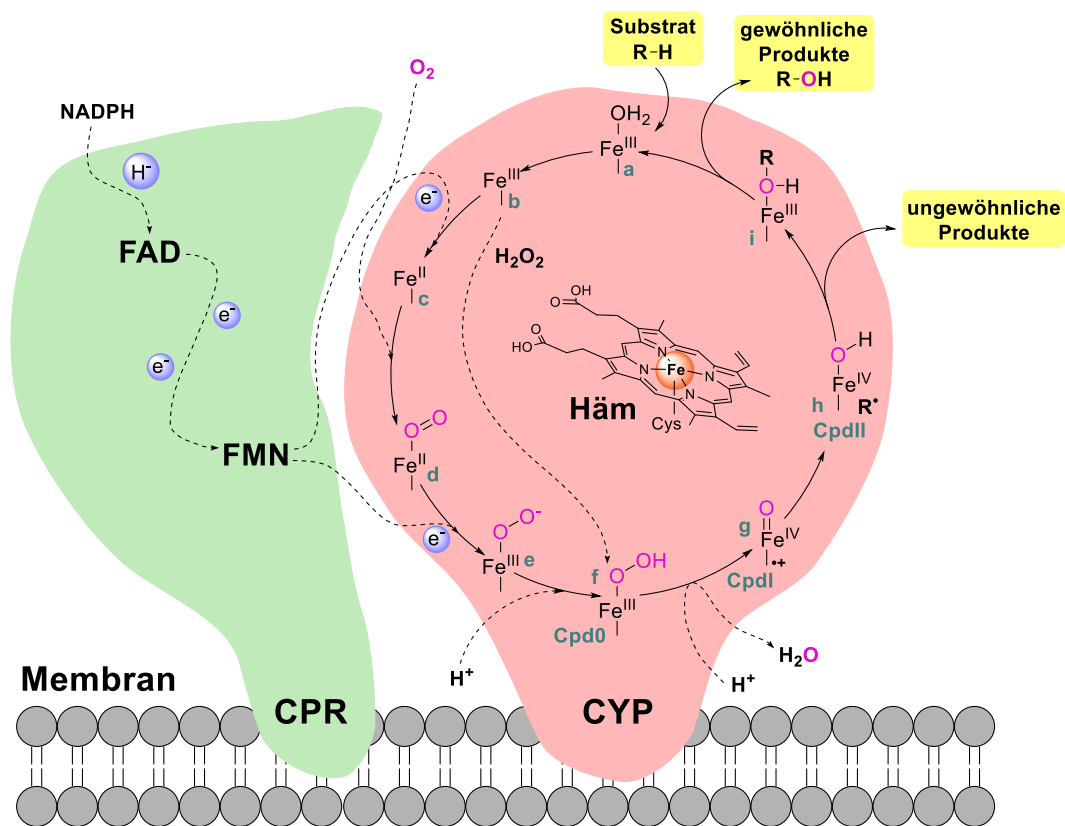


Abbildung 27: Katalytischer Zyklus von CYP der Klasse II aus Pilzen

Bei ungewöhnlichen Reaktionen kann anstelle der Bindung des Hydroxylradikals [HO•] mit dem Substratradikal R• die Abstraktion eines weiteren Wasserstoffatoms oder eines Elektrons (e⁻) vom Substrat erfolgen, um ein Diradikal oder ein Carbokationintermediat zu erzeugen, welches weitere Reaktionen wie intramolekulare Additionen oder Rekombination mit einem anderen Radikal durchlaufen kann und somit zur Bildung macher ungewöhnlicher CYP-Produkte führt (z.B. Substratdimere).^{381,389,390} Neben CpdI (g) und dem Cpd0 (f) können möglicherweise auch andere Stufen während des Reaktionszyklus verschiedene katalytische Rollen einnehmen und damit für die Bildung ungewöhnlicher CYP-Produkte verantwortlich sein.³⁸¹

1.6.4.4 Aromatische Hydroxylierung und Dehydrogenierung katalysiert durch CYPs

Aufgrund der enormen katalytischen Versatilität und ihrer weiten Verbreitung wurden CYPs schon als die vielseitigsten Enzyme der Natur bezeichnet.³⁹¹ Es ist daher nicht verwunderlich, dass CYPs an der Biosynthese und Diversifizierung einer Vielzahl von Sekundärmetaboliten beteiligt sind und im Vergleich zu anderen Klassen modifizierender Enzyme besonders hervorstechen. Zu ihren Substraten gehören unter anderem Polyketide, nicht-ribosomale Peptide, Polyketid-NRP Hybridprodukte, Terpene und Meroterpene.³⁹² Aufgrund der umfangreichen Abundanz im Sekundärmetabolismus werden im Folgenden nur zwei kurze Beispiele mit konkreter Relevanz für diese Arbeit besprochen: die Hydroxylierung aromatischer Substrate und die CYP-vermittelte Dehydrogenierung.

Während der Biosynthese des erst vor kurzem isolierten Cyclohexenols Trichoxid in *Trichoderma virens* konnte festgestellt werden, dass die CYP VirE das phenolische Intermediat Virensol B am aromatischen Ring hydroxyliert, um so Virensol A zu bilden (Abbildung 28).²⁴⁴ Dabei ist erwähnenswert, dass die aromatische Hydroxylierung durch CYPs im Gegensatz zur Hydroxylierung von sp^2 - oder sp^3 -hybridisierten C–H-Bindungen aliphatischer Kohlenwasserstoffe mechanistisch etwas vom in Kapitel 1.6.4.3 geschilderten katalytischen Zyklus abweichen kann. Die homolytische Spaltung der C–H-Bindungen an einem Aromaten ist nicht einfach. Die Bindungsenergie von Benzol beispielsweise beträgt $112,9 \text{ kcal mol}^{-1}$, was die von aliphatischen Alkanen ($90 - 101 \text{ kcal mol}^{-1}$) und sogar Methan ($105 \text{ kcal mol}^{-1}$) übersteigt.³⁹³ Außerdem hat Benzol ein hohes Redoxpotenzial, was die Bildung eines Substratradikals durch einen ein-Elektron-Oxidationsprozess, wie es in Abbildung 27 Schritt (h) beschrieben ist, erschwert. Folglich kann die CYP-katalysierte Hydroxylierung von Benzol nicht wie oben erläutert durch eine Abstraktion eines Wasserstoffs erfolgen. Stattdessen wird vermutet, dass die aromatische Hydroxylierung durch einen direkten Elektronentransfer vom Benzolring auf CpdI (Abbildung 27 (g)) oder durch einen elektrophilen Angriff des Benzolrings auf CpdI initiiert wird.³⁹⁴ Alternativ könnte die Abstraktion eines Wasserstoffs auch an einem Substituenten des aromatischen Rings, wie der phenolischen Hydroxygruppe von Virensol B erfolgen (Bindungsenergie von O–H in Phenol z.B. nur zwischen $86,7$ und $90,4 \text{ kcal mol}^{-1}$), woraufhin eine Umsiedlung des Radikals zur Position der Hydroxylierung erfolgen würde.³⁹⁴

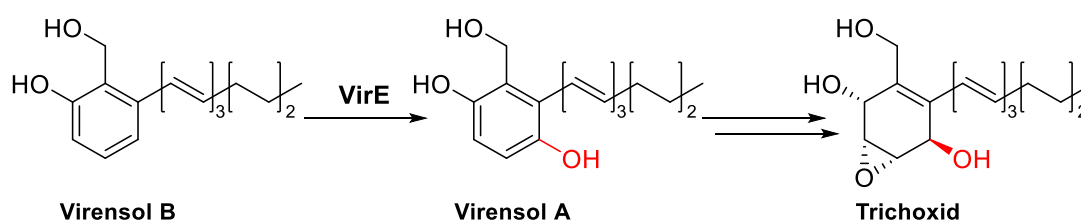


Abbildung 28: Aromatische Hydroxylierung von Virensol B durch die CYP VirE

Als eine von vielen ungewöhnlichen Reaktionen können CYPs die Dehydrogenierung einiger organischer Moleküle katalysieren anstatt sie zu hydroxylieren. Die CYP-vermittelte Entsättigung einer C–C-Bindung kann sowohl in der Verstoffwechselung von Xenobiotika, als auch in biosynthetischen Prozessen wie der Bildung von Sterolen beobachtet werden.³⁹⁵ Bei dieser Reaktion wird molekularer Sauerstoff vollständig zu zwei Molekülen Wasser reduziert und hinterlässt ein Olefin als finales organisches Produkt. Sie folgt der Summenformel $R_2HC-CHR'_2 + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow R_2C=CR'_2 + H_2O$. Eine relativ gut untersuchte Dehydrogenierung durch ein CYP findet z.B. bei der Verstoffwechselung des Antikonvulsivums Valproinsäure im menschlichen Körper statt, welches als Anti-Epilepsie-Medikament eingesetzt wird.³⁹⁶ Es wurde herausgefunden, dass besonders ein Stoffwechselprodukt, die 2-Propylpent-4-ensäure, aufgrund seiner endständigen Doppelbindung und seiner Ähnlichkeit zu dem bekannten Inhibitor der Fettsäureoxidation Pent-4-ensäure hepatotoxisch wirkt.³⁹⁷ Die Dehydrogenierung von Valproinsäure kann in unterschiedlichem Ausmaß von CYPs aus verschiedenen Familien katalysiert werden und je nach CYP-Isozym wird zusätzlich auch mehr oder weniger eines an C4-hydroxylierten Produkts gebildet (Abbildung 29). Die Bildung weiterer hydroxylierter oder dehydrogenerter Produkte sind ebenfalls möglich.

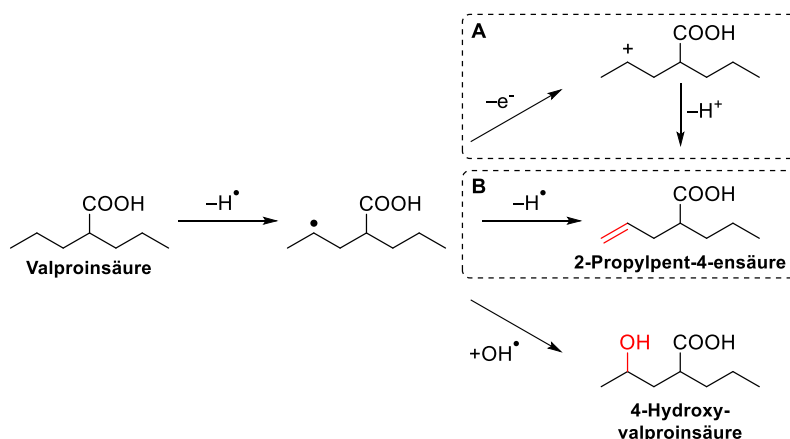


Abbildung 29: Vorgeschlagene Routen zur Dehydrogenierung von Valproinsäure durch CYPs

CYPs der Familien CYP2, CYP3 und CYP4 katalysieren sowohl die Dehydrogenierung als auch die Hydroxylierung von Valproinsäure. Dabei entstehen noch mehr als nur die zwei abgebildeten Produkte. Die Dehydrogenierung kann nach Bildung des Substratradikals entweder über Abgabe eines Elektrons und eines Protons (**A**) oder direkt durch die Abgabe eines weiteren Wasserstoffatoms erfolgen (**B**).

Es wird vermutet, dass der katalytische Zyklus bis zur Bildung von Cpdl (Abbildung 27 (g)) gewöhnlich verläuft und zur Abstraktion eines Wasserstoffatoms an C4 der Valproinsäure führt. Danach kann entweder eine Hydroxylierung nach dem beschriebenen *oxygen rebound*-Mechanismus erfolgen oder einer von zwei vorgeschlagenen Mechanismen führt zur Dehydrogenierung zwischen C4 und C5. Der erste Mechanismus involviert den Transfer eines Elektrons weg vom Substratradikal, zur Erzeugung eines Kations, welches anschließend deprotoniert wird, um das Olefin zu erzeugen (Abbildung 29A). Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass eine Abstraktion eines zweiten Wasserstoffatoms direkt zum terminalen Alken führt (Abbildung 29B). Ein weiteres prominentes Beispiel für eine CYP-katalysierte Dehydrogenierung ist die pilzliche Sterol-C22-Desaturase (CYP61; kommt auch in anderen Eukaryoten vor, unterscheiden sich aber in der Substratpräferenz), die für die Einführung der Δ^{22} -Doppelbindung in Ergosterol verantwortlich ist.³⁹⁵ Auch Capsaicinoide, 3-Methylindol oder Laurinsäure können durch verschiedene CYPs dehydrogeniert werden.³⁹⁵

Für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten sind auch zahlreiche CYP-vermittelte Dehydrogenierungen bekannt. Die CYP VidD aus dem Biosyntheseweg des Furanosteroids Demethoxyviridin in *Nodulisporium* sp. (no. 65-17-2-1) ist für die Entsättigung der Bindung zwischen C11 und C12 verantwortlich (Abbildung 30A).³⁹⁸ Während der Bildung des Meroterpenoids Ascochlorin in *Acremonium* *egyptiacum* wird durch die CYP AscG zwischen C12 und C13 des Intermediats Illicolin C bekanntermaßen eine weitere Doppelbindung eingeführt (Abbildung 30B).³²² Zur Vorbereitung der intramolekularen Diels-Alder-Reaktion während der Bildung der zyklischen-Dipeptid-Derivate Brevianamid A und B wird vermutet, dass die CYP BvnD ein Intermediat an C11 hydroxyliert, was eine spontane Dehydrierung/Tautomerisierung zur Folge hat, um eine Doppelbindung zwischen einem Kohlenstoff und einem Stickstoff zu erzeugen, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass die C–N-Bindung möglicherweise direkt entsättigt wird (Abbildung 30C).³⁹⁹ Neben BvnD gibt es nur noch ein weiteres Beispiel für eine CYP-vermittelte Dehydrogenierung an einem zyklischen Dipeptid in einem Pilz. In der Biosynthese der Mykotoxine Roquefortin C und Meleagrin in *P. chrysogenum* katalysiert das CYP

Pc21g15470 die Bildung der *exo*-Doppelbindung am 2,5-Diketopiperazinring des cyclo-L-His-L-Trp-Derivats Roquefortin D zu Roquefortin C (Abbildung 30D).⁴⁰⁰

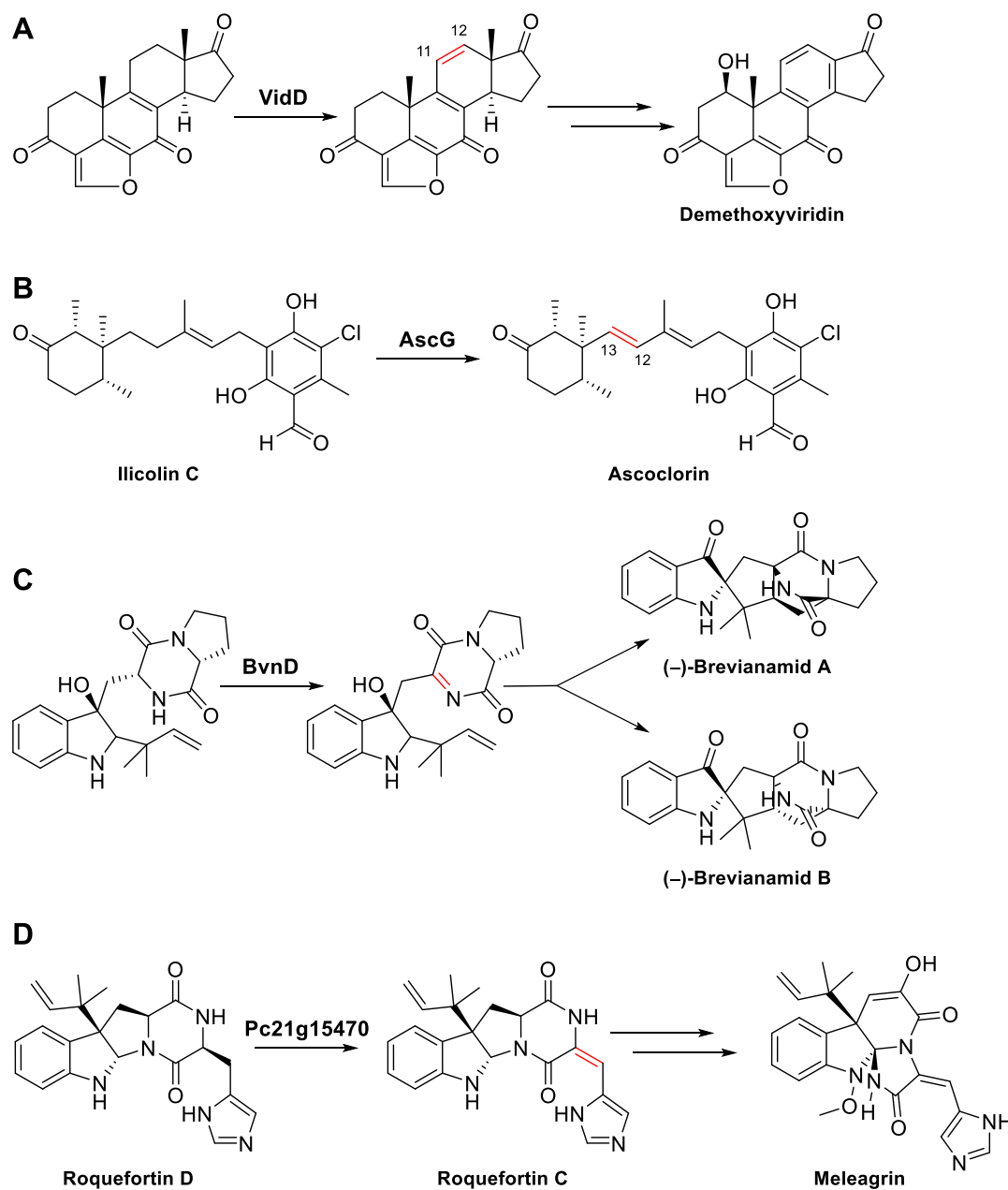


Abbildung 30: Beispiele für Dehydrogenierungen durch pilzliche CYPs in der Sekundärmetabolitbiosynthese

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen behandelt werden:

Untersuchungen zur Flavoglaucin-Biosynthese in *Aspergillus ruber* QEN-0407-G2

Flavoglaucin und seine Analoga wurden schon oft aus verschiedenen Vertretern der Ascomyceten isoliert. Aufgrund seiner verschiedenen biologischen Aktivitäten war insbesondere Flavoglaucin schon mehrmals Gegenstand wissenschaftlicher Studien. Die Biosynthese dieser Substanzfamilie war allerdings noch nicht bekannt. Aus diesem Grund sollte der verantwortliche biosynthetische Gencluster für die Bildung von Flavoglaucin und seinen Analoga in *A. ruber* QEN-0407-G2 identifiziert werden. Dabei sollte der Schwerpunkt besonders auf der Reihenfolge der biosynthetischen Schritte und die an der jeweiligen Reaktion beteiligten Enzyme liegen.

Für das Erreichen dieses Ziels wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Identifikation des potenziellen BGC durch Genome Mining
- Ermittlung der genetischen Manipulierbarkeit von *A. ruber* QEN-0407-G2
- Umgehen der schlechten genetischen Manipulierbarkeit von *A. ruber* durch heterologe Expression des identifizierten *fog*-Clusters in *A. nidulans* LO8030
- Gezielte Deletion einzelner oder mehrerer Gene im heterologen Expressionsstamm
- Überexpression der HR-PKS FogA in *A. nidulans* LO8030
- *in vitro*-Enzymassays mit der rekombinant in *E. coli* hergestellten Prenyltransferase FogH
- Fütterungsexperimente mit einem *A. nidulans fogF*-Überexpressionsstamm

Die Isolierung und Strukturaufklärung der in Deletions- oder Überexpressionsstämmen bzw. Enzymassays entstandenen Produkte wurde durch meine Kooperationspartnerin Frau Dr. Huomiao Ran durchgeführt, sodass die relevanten Strukturdaten nicht in dieser Arbeit zu finden sind, sondern unserer gemeinsamen Publikation entnommen werden können.⁴⁰¹

Untersuchungen zur Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie

Bisher wurden nur die Prenyltransferasen EchPT1 und EchPT2 im Kontext der Echinulinbiosynthese näher untersucht. Es wurde zwar ein potenzieller BGC identifiziert, aber außer den Genen für die Prenyltransferasen wurde die Beteiligung der anderen Gene an der Bildung der Echinuline nicht bestätigt. Es wurde postuliert, dass die im identifizierten Cluster kodierte CYP EchP450 die Dehydrogenierung beider *exo*-Doppelbindungen am 2,5-Diketopiperazinring durchführen kann, experimentelle Daten dazu waren allerdings nicht verfügbar. Daher sollte untersucht werden, ob der identifizierte Cluster in seiner Vollständigkeit an der Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie betei-

ligt ist. Dabei sollte die Aufklärung der Reaktion von EchP450 erfolgen. Außerdem sollte eine Erklärung für die unterschiedlichen Verhältnisse zwischen den verschiedenen Echinulinanaloga gefunden werden.

Für das Erreichen dieses Ziels wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Heterologe Expression des postulierten *ech*-Clusters in *A. nidulans* LO8030
- Isolierung und Identifikation der akkumulierten Produkte
- Erweiterung des *ech*-Clusters im Expressionsstamm um drei weitere potenzielle Oxidoreduktasegene
- Herstellung von rekombinanter EchP450 in *E. coli*
- Fütterungsexperimente mit *S. cerevisiae echP450*-Überexpressionsstämmen
- Fütterungsexperimente mit einem *A. nidulans echP450*-Überexpressionsstamm
- *in vitro*-Enzymassays mit der rekombinant in *E. coli* hergestellten EchPT2 und konkurrierenden Substraten
- *in vitro*-Enzymassays mit der rekombinant in *E. coli* hergestellten EchPT2 mit verschiedenen Substratkonzentrationen

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Chemikalien und Puffer

3.1.1 Chemikalien

Die benutzten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in der Qualität p.A. (per Analysis) von den Firmen Acros Organics (Fair Lawn, NJ, USA), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim) und VWR Chemicals (Radnor, PA, USA) bezogen.

3.1.2 Geräte

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	VX-150	Systec (Linden)
FPLC	ÄKTAprime™ plus	GE Healthcare (Chicago, IL, USA)
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LDplus	Martin Christ (Osterode am Harz)
Geldokumentationssystem	FastGene® B/G LED Transilluminator mit FAS Digi Imaging System	Nippon Genetics Europe (Düren)
Gelelektrophoresesysteme	Biostep GH303 (Agarose-Gel)	Biostep (Burkhardtsdorf)
	Mini-PROTEAN® 3 Elektrophorese Zelle (SDS-PAGE)	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Heizblock / Thermomix	AccuBlock Digital Dry Bath	Labnet (Edison, NJ, USA)
	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Homogenisatoren	Minilys personal homogenizer	Bertin Instruments (Montigny-le-Bretonneux, Frankreich)
	T 18 digital ULTRA-TURRAX® Dispergierer	IKA (Staufen)
HPLC / HPLC-MS	Agilent 1200 HPLC	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
	Agilent 1260 HPLC gekoppelt mit micrOTOF-Q III Massenspektrometer	Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA)
Inkubatoren	Ecotron Schüttelinkubator	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
	Multitron Standard Schüttelinkubator	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
	Jouan EB280 Brutschrank	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	Gallenkamp 10X400 Schüttelinkubator	Sanyo Gallenkamp PLC (Loughborough, UK)
Magnetrührer	VMS-C7 Advanced	VWR (Radnor, PA, USA)
	MR 3001	Heidolph Instruments (Schwabach)
Mikroskop	B1-252SP	Motic Europe (Wetzlar)
Mikrowelle	NN-SD452W	Panasonic (Kadoma, Japan)

NMR-Spektrometer	JEOL ECA-500	JEOL Germany (Freising)
Orbitalschüttler	TR-125	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
pH-Meter	pH 211 Microprocessor	Hanna Instruments (Vöhringen)
Pipetten	Discovery Comfort Einkanalpipetten	PZ HTL S.A. (Warschau, Polen)
Pumpen	Membranpumpe	Vacuubrand (Wertheim)
	Welch ILMVAC™ Drehschieberpumpe P12Z	Fisher Scientific (Hampton, NH, USA)
Rotationsverdampfer	Rotavapor-R	Büchi (Flawil, Schweiz)
Sicherheitswerkbank	ScanLaf Mars	LaboGene (Allerød, Dänemark)
Spannungsquelle	PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
	LLG-uniSPEC 2	LLG Labware (Meckenheim)
Thermocycler	MyCycler™ Thermal Cycler System	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
	T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin (Berlin)
Ultraschall-Zelldisruptor	Sonifier 250	Branson (Danbury, CT, USA)
Vakuumzentrifugen	RVC 2-18 CPlus	Martin Christ (Osterode am Harz)
	Univapo 100H	UniEquip (Martinsried)
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Waagen	Pioneer® Precision Balance PA4102C	Ohaus (Greifensee, Schweiz)
	Explorer® EX124	Ohaus (Greifensee, Schweiz)
Wippschüttler	Rocking Platform	VWR (Radnor, PA, USA)
Zählkammer	Neubauer-improved	Paul Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Zentrifugen	Biofuge Pico	Heraeus (Hanau)
	Fresco 17	Heraeus (Hanau)
	Multifuge X1R	Heraeus (Hanau)
	Sorvall MTX150 Mikro-Ultrazentrifuge	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
	Sorvall RC 6 Plus	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

3.1.3 Vorgepackte Säulen und Säulenmaterial für die Chromatographie

Tabelle 5: Verwendete Säulen und Säulenmaterial für die Chromatographie

Säule / Material	Hersteller
Protino™ Ni-NTA Agarose	Macherey-Nagel (Düren)
HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg	GE Healthcare (Chicago, IL, USA)
PD10 Sephadex G-25	GE Healthcare (Chicago, IL, USA)
Kieselgel 60 (0,04 – 0,063 mm)	Roth (Karlsruhe)
Kieselgel 60 (0,2 – 0,5 mm)	Roth (Karlsruhe)
Multospher 120 RP18 (5 µm, 250 x 2 mm)	CS Chromatographie Service (Langerwehe)
Multospher 120 RP18 (5 µm, 250 x 10 mm)	CS Chromatographie Service (Langerwehe)
ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm)	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
ZORBAX Eclipse XDB-C18 (5 µm, 250 x 9,4 mm)	Agilent (Santa Clara, CA, USA)

3.1.4 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Green und Sambrook, 2012 hergestellt.⁴⁰²

3.1.5 Sterilisation

Alle hitzestabilen Medien, sowie Materialien, mit denen steril gearbeitet werden musste, wurden im Autoklaven bei 121°C für 20 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril filtriert (Spritzenfilter Filtropur S 0.2, Porengröße 0,2 µm, Sarstedt, Nümbrecht).

3.2 Verwendete Materialien und Organismen

In den folgenden Tabellen findet sich die Auflistung der verwendeten Kits, Organismen, Vektoren, sowie Oligonukleotidprimer.

3.2.1 Molekularbiologische Kits

Tabelle 6: Kits

Kit	Hersteller
E.Z.N.A.® Fungal RNA Kit	Omega Bio-Tek (Norcross, GA, USA)
ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

3.2.2 Enzyme

Restriktionsenzyme, DNA-Polymerasen oder andere Enzyme wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den Herstellern Jena Bioscience (Jena), New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) oder Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

3.2.3 Vektoren

Die Begriffe Vektor und Plasmid werden in dieser Arbeit synonym verwendet.

Tabelle 7: Verwendete existierende oder kommerzielle Vektoren

Vektor	Genotyp	Beschreibung	Referenz
p5HY	gpdA(p)-hygB ^R (Teilsequenz: erste zwei Drittel) in pESC-URA	SplitMarker Vektor für Austausch von Genen in Ascomyceten; wird zusammen mit p3YG benutzt	403
p3YG	gpdA(p)-hygB ^R (Teilsequenz: letzte zwei Drittel) in pESC-URA	SplitMarker Vektor für Austausch von Genen in Ascomyceten; wird zusammen mit p5HY benutzt	403
pESC-URA	Amp ^R , HIS3, GAL1/10(p), C-terminaler FLAG-tag (MCS1), myc-Tag (MCS2)	Expressionsvektor für <i>S. cerevisiae</i> mit Möglichkeit zur Koexpression von zwei Genen mit FLAG- oder myc-Tag	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
pET28a(+)	Kan ^R , T7(p), 6xHis, MCS, T7 Terminator, <i>lacI</i>	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> mit T7-Promotorsystem und His-Tag wahlweise C- oder N-terminal	Merck (Novagen) (Darmstadt)
pQE-9	Amp ^R , T5(p), 6xHis, MCS, Lambda t0 Terminator	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> mit T5-Promotorsystem und N-terminalem His-Tag	Qiagen (Hilden)
pQE-70	Amp ^R , T5(p), MCS, 6xHis, Lambda t0 Terminator	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> mit T5-Promotorsystem und C-terminalem His-Tag	Qiagen (Hilden)
pPM13	<i>red1_SC</i> in pESC-URA	Expressionsvektor für Koexpression von Genen in <i>S. cerevisiae</i> zusammen mit der CPR NFIA_056739 aus <i>Neosartorya fischerii</i>	Dr. Peter Mai (nicht veröffentlicht)
pYWB2	Amp ^R , URA3, wA-Flanken, AfriboB, Amp ^R	Vektor zur Integration von Genen in den wA-PKS Lokus von <i>A. nidulans</i>	404
pVW83	<i>echPT2</i> von cDNA in pQE-9	Heterologe Expression von 6xHis- <i>echPT2</i> in <i>E. coli</i>	118
pVW84	<i>fogH</i> von cDNA in pQE-70	Heterologe Expression von 6xHis- <i>fogH</i> in <i>E. coli</i>	118
pVW90	<i>echPT1</i> von cDNA in pQE-9	Heterologe Expression von 6xHis- <i>echPT1</i> in <i>E. coli</i>	118
pYH-wA-Afp _{pyrG}	Amp ^R , URA3, wA Flanken, Afp _{pyrG} , Amp ^R	Vektor zur Integration von Genen in den wA-PKS Lokus von <i>A. nidulans</i>	405

Die Sequenzen für den *fog*-Cluster sind auf dem *unplaced genomic scaffold00012* im *A. ruber* CBS135680 Genom mit der GenBank-ID KK088422 zu finden. Der *ech*-Cluster befindet sich auf *scaffold00003* mit der GenBank-ID KK088413. In der Spalte Genotyp sind die Nummern der Start- und Endbase auf dem jeweiligen *scaffold* für die relevanten klonierten Sequenzen verzeichnet.

Tabelle 8: Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Vektoren

Vektor	Genotyp	Beschreibung
pJN002	<i>echP450</i> (Δ 1-38) (bp 1211426 – 1212913, <i>scaffold00003</i>) ohne Introns von cDNA in pET28a(+)	Heterologe Expression von <i>echP450</i> (Δ 1-38)-6xHis in <i>E. coli</i>
pJN003	<i>CYP17α-echP450</i> (Δ 1-38) (bp 1211426 – 1212913, <i>scaffold00003</i>) ohne Introns von cDNA in pET28a(+)	Heterologe Expression von <i>CYP17α-echP450</i> (Δ 1-38)-6xHis in <i>E. coli</i>
pJN004	<i>echP450</i> (bp 1211312 – 1212913, <i>scaffold00003</i>) ohne Introns von cDNA in pET28a(+)	Heterologe Expression von <i>echP450</i> -6xHis in <i>E. coli</i>
pJN006	1500 bp 5' von <i>fogH</i> (bp 239610 – 241109, <i>scaffold00012</i>) in p5HY	SplitMarker Vektor zur Deletion von <i>fogH</i> in <i>A. ruber</i> QEN-0407-G2
pJN007	1500 bp 3' von <i>fogH</i> (bp 242501 – 244028, <i>scaffold00012</i>) in p3YG	SplitMarker Vektor zur Deletion von <i>fogH</i> in <i>A. ruber</i> QEN-0407-G2
pJN008	1500 bp 5' von <i>fogA</i> (bp 230598 – 232196, <i>scaffold00012</i>) in p5HY	SplitMarker Vektor zur Deletion von <i>fogA</i> in <i>A. ruber</i> QEN-0407-G2
pJN009	1500 bp 3' von <i>fogA</i> (bp 221263 – 222762, <i>scaffold00012</i>) in p3YG	SplitMarker Vektor zur Deletion von <i>fogA</i> in <i>A. ruber</i> QEN-0407-G2
pJN012	<i>gpdA</i> (p)- <i>fogA</i> -500 bp 3' UTR (bp 222263 – 230597, <i>scaffold00012</i>) in pYWB2	Heterologe Expression von <i>fogA</i> in <i>A. nidulans</i> LO8030
pJN013	<i>echP450</i> (bp 1211312 – 1212913, <i>scaffold00003</i>) ohne Introns von cDNA in pPM13	Heterologe Expression von <i>echP450</i> in <i>S. cerevisiae</i>
pJN014	<i>fog</i> -Cluster (bp 222263 – 244370, <i>scaffold00012</i>) in pYWB2	Heterologe Expression des gesamten <i>fog</i> -Clusters in <i>A. nidulans</i> LO8030
pJN017	<i>gpdA</i> (p) mit anschließender Sfol-Schnittstelle in pYWB2	Basisvektor für die heterologe Expression von Genen unter Kontrolle des <i>gpdA</i> -Promoters in <i>A. nidulans</i> LO8030
pJN019	URA3, AmpR, <i>AfpYrG</i> flankiert von 1200 bp 5' (bp 239910 – 241109, <i>scaffold00012</i>) und 3' (bp 242501 – 243700, <i>scaffold00012</i>) von <i>fogH</i>	Deletion von <i>fogH</i> in <i>A. nidulans fog</i> -Cluster Expressionsstämmen
pJN020	URA3, AmpR, <i>AfpYrG</i> flankiert von 1200 bp 5' (bp 233892 – 235091, <i>scaffold00012</i>) und 3' (bp 236984 – 238183, <i>scaffold00012</i>) von <i>fogE</i>	Deletion von <i>fogE</i> in <i>A. nidulans fog</i> -Cluster Expressionsstämmen
pJN022	URA3, AmpR, <i>AfpYrG</i> flankiert von 1200 bp 5' (bp 234804 – 236003, <i>scaffold00012</i>) und 3' (bp 236984 – 238183, <i>scaffold00012</i>) von <i>fogD</i>	Deletion von <i>fogD</i> in <i>A. nidulans fog</i> -Cluster Expressionsstämmen

	<i>scaffold00012</i>) und 3' (bp 232290 – 233489, <i>scaffold00012</i>) von <i>fogD</i>	
pJN023	URA3, AmpR, <i>AfpYrG</i> flankiert von 1200 bp 5' (bp 238930 – 240129, <i>scaffold00012</i>) und 3' (bp 236008 – 237207, <i>scaffold00012</i>) von <i>fogF</i>	Deletion von <i>fogF</i> in <i>A. nidulans fog</i> -Cluster Expressionsstämmen
pJN025	URA3, AmpR, <i>AfpYrG</i> flankiert von 1200 bp 5' (bp 238307 – 239406, <i>scaffold00012</i>) und 3' (bp 240509 – 241608, <i>scaffold00012</i>) von <i>fogG</i>	Deletion von <i>fogG</i> in <i>A. nidulans fog</i> -Cluster Expressionsstämmen
pJN031	URA3, AmpR, <i>AfpYrG</i> flankiert von 1200 bp 5' (bp 230598 – 231797, <i>scaffold00012</i>) und 3' (bp 221595 – 222762, <i>scaffold00012</i>) von <i>fogA</i>	Deletion von <i>fogA</i> in <i>A. nidulans fog</i> -Cluster Expressionsstämmen
pJN037	<i>ech</i> -Cluster essenzielle Gene (bp 1198299 – 1215739, <i>scaffold00003</i>) in pYWB2	Heterologe Expression des <i>ech</i> -clusters in <i>A. nidulans</i> LO8030
pJN040	<i>fogF</i> (bp 237211 – 238929, <i>scaffold00012</i>) ohne Introns von cDNA in pET28a(+)	Heterologe Expression von <i>fogF</i> -6xHis in <i>E. coli</i>
pJN041	<i>fog</i> -Cluster ohne die kodierenden Sequenzen von <i>fogEFH</i> (bp 222263 – 235091, 238930 – 241109, 242501 – 244370, <i>scaffold00012</i>) in pYWB2	Heterologe Expression des <i>fog</i> -Clusters ohne die Gene <i>fogEFH</i> in <i>A. nidulans</i> LO8030
pJN042	<i>fogF</i> (bp 237211 – 238929, <i>scaffold00012</i>) ohne Introns von cDNA in pQE-70	Heterologe Expression von <i>fogF</i> -6xHis in <i>E. coli</i>
pJN044	<i>fogF</i> (bp 237211 – 238929, <i>scaffold00012</i>) ohne Introns von cDNA in pET28a(+)	Heterologe Expression von 6xHis- <i>fogF</i> in <i>E. coli</i>
pJN051	URA3, AmpR, <i>AfpYrG</i> flankiert von 1200 bp 5' (bp 234369 – 239406, <i>scaffold00012</i>) und 3' (bp 240509 – 243099, <i>scaffold00012</i>) von <i>fogG</i> aus dem Stamm <i>A. nidulans</i> JN020	Deletion von <i>fogG</i> in <i>A. nidulans</i> JN020
pJN052	<i>fogF</i> -500 bp 3' UTR (bp 236714 – 238929, <i>scaffold00012</i>) in pJN017	Heterologe Expression von <i>fogF</i> in <i>A. nidulans</i> LO8030
pJN053	URA3, AmpR, <i>AfpYrG</i> flankiert von 1200 bp 5' (bp 243871 – 245070, <i>scaffold00012</i>) und 3' (bp 241423 – 242622, <i>scaffold00012</i>) von <i>fogl</i>	Deletion von <i>fogl</i> in <i>A. nidulans fog</i> -Cluster Expressionsstämmen
pJN060	URA3, AmpR, <i>AfpYrG</i> flankiert von 1200 bp 5' (bp 230050 – 231249, <i>scaffold00012</i>) und 3' (bp 232171 – 233370, <i>scaffold00012</i>) von <i>fogB</i>	Deletion von <i>fogB</i> in <i>A. nidulans fog</i> -Cluster Expressionsstämmen

pJN061	URA3, AmpR, <i>Afp_{pyrG}</i> flankiert von 1200 bp 5' (bp 231231 – 232430, <i>scaffold00012</i>) und 3' (bp 233094 – 234293, <i>scaffold00012</i>) von <i>fogC</i>	Deletion von <i>fogC</i> in <i>A. nidulans fog</i> -Cluster Expressionsstämmen
pJN068	<i>echP450</i> -500 bp 3' UTR (bp 1213416 – 1211312, <i>scaffold00003</i>) in pJN017	Heterologe Expression von <i>echP450</i> in <i>A. nidulans</i> LO8030
pJN074	EURHEDRAFT_528589 bis EURHEDRAFT_400000 (+ 500 bp 5' von _400000 and 1506 bp 3' von _528589) (bp 1214540 – 1228315, <i>scaffold00003</i>) in pYH-wA-pyrG ohne den wA-Promotor	Heterologe Expression der Gene EURHEDRAFT_528589 bis EURHEDRAFT_400000 zusammen mit den essenziellen Genen des <i>ech</i> -Clusters in <i>A. nidulans</i> JN019

3.2.4 Längen und Molekulargewichtstandards

Tabelle 9: Standards

Standard	Hersteller
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Amersham Filtration Calibration Kit	GE Healthcare (Chicago, IL, USA)
Amersham LMW Calibration Kit for SDS electrophoresis	GE Healthcare (Chicago, IL, USA)

3.2.5 Oligonukleotidprimer

Die folgenden Oligonukleotide wurden von den Firmen Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen) oder Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen. Durch Zugabe der von der Firma angegebenen Menge ddH₂O wurde die Konzentration auf 100 µM eingestellt. Die Primer wurden auf eine Arbeitskonzentration von 10 µM verdünnt und entweder für eine PCR oder zum Sequenzieren benutzt. Die Basen in Großbuchstaben binden im Insert und die Basen in Kleinbuchstaben entsprechen dem homologen Überhang zum linearisierten Vektor oder dem jeweiligen homologen Fragment. Unterstrichene Basen sind durch Primer eingefügte Schnittstellen oder Sequenzen für Tags bzw. zusätzliche Basenpaare zum Anpassen des Leserahmens.

Tabelle 10: PCR-Primer

Primerbezeichnung	Sequenz (5' nach 3')	Beschreibung
prJN023	tgtttaactttaagaaggagatataccatggATGTGG-GACTCCCC	Klonierung von pJN004; Homologe Überhänge zu pET28a(+) linearisiert mit NcoI und XhoI
prJN024	gatctcagtgggtggtggtggtggtgctcgag-TTCCGCCCTTCTG	
prJN025	ttaactttaagaaggagatataccatggatgAGATCTCGTT-CTCCAAG	Klonierung von pJN002 zusammen mit prJN024; Homologe Überhänge zu pET28a(+) linearisiert mit NcoI und XhoI

prJN026	taccatggatggctctgttatttagcagttttAGATCTCGTT-CTTCCAAG	Klonierung von pJN003; Fusion von <i>CYP17α</i> (1-8) mit <i>echP450</i> (Δ1-38) über PCR mit prJN024
prJN030	gtttaactttaagaaggagatataccatggatggCTCTGTTAT-TAGCAG	Klonierung von pJN003; Fusion von <i>CYP17α</i> (1-8) mit <i>echP450</i> (Δ1-38) über konsequente PCR mit prJN024 basierend auf Produkt von PCR mit prJN024 und prJN026; Homologe Überhänge zu pET28a(+) linearisiert mit NcoI und XhoI
prJN041	ctggcgaagaattgttaattaagagctcaTGCTGTGCG-GAGGGTAGAGC	Klonierung von pJN006; Homologe Überhänge zu p5HY linearisiert mit NotI und BglII
prJN042	ctaattcaaccctcactaaagggcgccTTTGACA-GATAACTGCTTACG	
prJN043	cgtaatacgactcactatagggcccgcgATATGGATTAT-GGGAAATG	Klonierung von pJN007; Homologe Überhänge zu p3YG linearisiert mit Sall und Slal
prJN044	ttagctagccggtaccaagcttactcgaGTCTAGGTGCAT-GTCAGAC	
prJN047	taatacgactcactatagggcccgcgTATTTTTTCCTGT-TAGACTC	Klonierung von pJN009; Homologe Überhänge zu p3YG linearisiert mit Sall und Slal
prJN048	ttagctagccggtaccaagcttactcgaCCCTCCGACTT-CGACTCCG	
prJN053	ggcgaagaattgttaattaagagctcagatcACGTGCATA-GAATTGAGG	Klonierung von pJN008; Homologe Überhänge zu p5HY linearisiert mit NotI und BglII
prJN054	ttcaaccctcactaaagggcgccCGACTCCAA-GCCGACAACGCCGCTC	
prJN055	gtaatccatcgatactagtgcggccTTCCGCCCCCTCTG	Klonierung von pJN013; Homologe Überhänge zu pPM13 linearisiert mit EcoRI und NotI
prJN056	gtaagaattttgaaaattcgaattATGTGGGACTCCCC	
prJN059	tgatgtcgagaatggctgttggtcCACATGGGATTAAAA-TATGGTGTTG	Klonierung von pJN012; Amplifikation von pJN017 mit homologen Überhängen zu <i>fogA</i>
prJN060	cgatgcatggcggtcatcattcatGGTGATGTCTGCTCAA-GCGGGGTAG	
prJN061	ctaccccgcttgagcagacatcac-cATGAATGATGACCCGCCATGCATCG	Klonierung von pJN012; Amplifikation von <i>fogA</i> mit homologen Überhängen zu pJN017
prJN062	caacaccatattttaatccatgtg-GACCCAACAGCCATTCTCGACATCA	
prJN063	cttcctagcaacgagcccc	Klonierung von pJN012; Amplifikation von <i>fogA</i> in zwei Fragmenten zusammen mit prJN062
prJN064	acaacagggacaccgtgggg	Klonierung von pJN012; Amplifikation von <i>fogA</i> in zwei Fragmenten zusammen mit prJN061

Material und Methoden

prJN065	ggccacgtactcgactgg	Nachweis von <i>fogA</i> ; zusammen mit prJN064
prJN066	cacatgggattaaaatatgg	Amplifikation von <i>AfriboB</i>
prJN067	gaccggggtctctag	
prJN068	ccgatacgcattacgg	Kontrolle der Deletion von <i>fogA</i> in <i>A. ruber</i> QEN-0407-G2; Amplifikation der 5'-Region, zusammen mit prJN078
prJN069	atgactgaccagctcc	Kontrolle der Deletion von <i>fogA</i> in <i>A. ruber</i> QEN-0407-G2; Amplifikation der 3'-Region, zusammen mit prJN079
prJN070	cttctggatttaggatgaagg	Kontrolle der Deletion von <i>fogH</i> in <i>A. ruber</i> QEN-0407-G2; Amplifikation der 5'-Region, zusammen mit prJN078
prJN071	agccgcgataatttccg	Kontrolle der Deletion von <i>fogH</i> in <i>A. ruber</i> QEN-0407-G2; Amplifikation der 3'-Region, zusammen mit prJN079
prJN072	atggctttacaacgacc	Nachweis von <i>fogH</i>
prJN073	ttataccgcagttttctgc	
prJN078	gtttgactgcattgtgc	Kontrolle der Deletion von Genen in <i>A. ruber</i> QEN-0407-G2; bindet im 5' Teil der Hygromycin B Resistenzkassette
prJN079	gcagcaaagagtgcc	Kontrolle der Deletion von Genen in <i>A. ruber</i> QEN-0407-G2; bindet im 3' Teil der Hygromycin B Resistenzkassette
prJN080	gatgtcgagaatggctgttgggtcgatccCACATGG-GATTAAAATATGG	Klonierung von pJN014; Amplifikation von pYWB2 mit prJN080 und prJN091, Amplifikation des <i>fog</i> -Clusters in 5 Fragmenten mit den restlichen Primern
prJN081	caccatattttaatcccatgtGGATCGAC-CCAACAGCCATTCTCGACA	
prJN082	aggaagacgcagatgaatgcc	
prJN083	catggcatctccttagggcg	
prJN084	cctcgatgacgacaccgtag	
prJN085	tgattcggagggtcgatccg	
prJN086	tttgactggttgaatcgcttgg	
prJN087	tgctcttcctcgcaaagc	
prJN088	agataactgcttacgagctgagc	
prJN089	gggctacgcatcttcatctggg	

prJN090	cggacttgactctccttctctgatcGGATCCAGG-GAGGGGTCCGGTG	
prJN091	ctcgctcaccggacccccctcctggatccGATCAGGAGAAG-GAGAGTC	
prJN098	ggacttgactctccttctctgatcg-gatccCCGATAGCTCTGCAAAGG	Klonierung von pJN017; Einfügen einer Sfol-Schnittstelle
prJN099	gcctcaacaccatattttaatcccatgtgGGCGCCGGTGAT-GTCTGCTC	
prJN100	ctaacagctaccccgcttgagcagacatcaccggcATGGATG-GAAAAAC	Klonierung von pJN018; Amplifikation des 5. Fragments des <i>fog</i> -Cluster (zusammen mit prJN089) mit homologem Überhang zu pJN017 lineariisiert mit Sfol
prJN101	cctcaacaccatattttaatcccatgtgggcGAC-CCAACAGCCATTCTC	Klonierung von pJN018; Amplifikation des 1. Fragments des <i>fog</i> -Cluster (zusammen mit prJN082) mit homologem Überhang zu pJN017 lineariisiert mit Sfol
prJN102	atcccttattcctttgaacc	Sequenzierung von Genen unter Kontrolle des <i>gpdA</i> -Promotors vor allem in pJN017; bindet im <i>gpdA(p)</i>
prJN104	aactcaattgcctgatc	Kontrolle der Deletion von <i>fogl</i> ; Amplifikation der 5'-Region zusammen mit prJN167
prJN105	tgttgatatcgaagcgc	Sequenzierung von Genen in pJN017; bindet in <i>Afribo</i>
prJN115	gagagtattctgtgtctg	Amplifikation von <i>AfpYrG</i>
prJN116	attctgtctgagaggag	
prJN117	caggggataacgcagg	
prJN118	acacaggaaacagctatgac	Amplifikation des <i>E. coli</i> ori/Amp ^R mit ScURA-CEN/ARS als Rückgrat eines <i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> Shuttlevektors
prJN119	tttgctcacatgttcttctcgcgttatcccctgGACCG-GAAACACTCC	Klonierung von pJN019; Amplifikation von 1200 bp 5' von <i>fogH</i> ; Überhang zu <i>E. coli</i> ori/Amp ^R und <i>AfpYrG</i>
prJN120	catatttcgtcagacacagaataactctcTTTGACA-GATAACTGCTTAC	
prJN121	cacgcacagtgcctcctctcagacagaatATATGGATTAT-GGGAAATG	Klonierung von pJN019; Amplifikation von 1200 bp 3' von <i>fogH</i> ; Überhang zu ScURA-CEN/ARS und <i>AfpYrG</i>
prJN122	attcgtaatcatggatcatagctgttctctgtgtGCATTACATT-CGCAC	
prJN123	ctcacatgttcttctcgcgttatcccctgAGAACGTTCA-CATCGAATG	Klonierung von pJN020; Amplifikation von 1200 bp 5' von <i>fogE</i> ; Überhang zu <i>E. coli</i> ori/Amp ^R und <i>AfpYrG</i>
prJN124	aacatatttcgtcagacacagaataactctcTGTGATAATT-GAAGTTTG	

Material und Methoden

prJN125	cacgcatcagtcctcctctcagacagaatATTGTCATTCT-CATATGG	Klonierung von pJN020; Amplifikation von 1200 bp 3' von <i>fogE</i> ; Überhang zu ScURA-CEN/ARS und <i>AfpYrG</i>
prJN126	cgtaatcatggcatagctgtttcctgtgtGGATTCAACTTT-GGCATTG	
prJN127	ttgctcacatgttcttctcgttatcccctgGTTGAAAACAT-GGCTG	Klonierung von pJN060; Amplifikation von 1200 bp 5' von <i>fogB</i> ; Überhang zu <i>E. coli</i> ori/Amp ^R und <i>AfpYrG</i>
prJN128	acatatctcgtcagacacagaataactctcTTTAGTAGAT-GTCTTTGGC	
prJN129	tcacgcatcagtcctcctctca-gacagaatTAAACTAGTGCATTGTAC	Klonierung von pJN061; Amplifikation von 1200 bp 3' von <i>fogC</i> ; Überhang zu ScURA-CEN/ARS und <i>AfpYrG</i>
prJN130	attcgtaatcatggcatagctgtttcctgtgtATTGGTT-CGATCGGAG	
prJN131	tcacatgttcttctcgttatcccctgAAGTAGT-GATCCCGAAATAG	Klonierung von pJN022; Amplifikation von 1200 bp 5' von <i>fogD</i> ; Überhang zu <i>E. coli</i> ori/Amp ^R und <i>AfpYrG</i>
prJN132	cacaacatatttctcgtcagacacagaataactctcTTT-GACGGCCGTAGG	
prJN133	acgcatcagtcctcctctcagacagaatATTACCATGGAAATATAGGG	Klonierung von pJN022; Amplifikation von 1200 bp 3' von <i>fogD</i> ; Überhang zu ScURA-CEN/ARS und <i>AfpYrG</i>
prJN134	tcgtaatcatggcatagctgtttcctgtgtTTCGGGCATGCATGGTTG	
prJN135	gctcacatgttcttctcgttatcccctgCGTGACGAG-GACGGCATC	Klonierung von pJN023; Amplifikation von 1200 bp 5' von <i>fogF</i> ; Überhang zu <i>E. coli</i> ori/Amp ^R und <i>AfpYrG</i>
prJN136	aacatatctcgtcagacacagaataactctcTGCGGTT-CGTCTGTCCCG	
prJN137	tcacgcatcagtcctcctctcagacagaatGTTACGTATATAGCTTG	Klonierung von pJN023; Amplifikation von 1200 bp 3' von <i>fogF</i> ; Überhang zu ScURA-CEN/ARS und <i>AfpYrG</i>
prJN138	attcgtaatcatggcatagctgtttcctgtgtACCCG-GAGAAAATTAC	
prJN140	catatttctcgtcagacacagaataactctcATTGAAATTA-CAAGTAGAAG	Klonierung von pJN025; Amplifikation von 1200 bp 5' von <i>fogG</i> zusammen mit prJN169; Überhang zu <i>E. coli</i> ori/Amp ^R und <i>AfpYrG</i>
prJN141	cacgcatcagtcctcctctcagacagaatCTCTATTTTCTTAGCGC	Klonierung von pJN025; Amplifikation von 1200 bp 3' von <i>fogF</i> zusammen mit prJN170; Überhang zu ScURA-CEN/ARS und <i>AfpYrG</i>
prJN143	tatcactctgctagcgcc	Kontrolle der Deletion von <i>fogH</i> ; Amplifikation der 5'-Region zusammen mit prJN167
prJN144	actcacaagacgcgcc	Kontrolle der Deletion von <i>fogH</i> ; Amplifikation der 3'-Region zusammen mit prJN168
prJN145	atggctttacaaacgacc	Nachweis von <i>fogH</i>

prJN146	tcttcctcgacgatcgg	
prJN147	ggaaattctccgcaagagg	Kontrolle der Deletion von <i>fogE</i> ; Amplifikation der 5'-Region zusammen mit prJN167
prJN148	atgccgaattattctgggg	Kontrolle der Deletion von <i>fogE</i> ; Amplifikation der 3'-Region zusammen mit prJN168
prJN149	atgataacggcctcatcag	Nachweis von <i>fogE</i>
prJN150	agtttcataaggtcgacg	
prJN151	tgaagctgtaatccgggtg	Kontrolle der Deletion von <i>fogB</i> ; Amplifikation der 5'-Region zusammen mit prJN167
prJN152	ccaccggagcaattgtg	Kontrolle der Deletion von <i>fogB</i> ; Amplifikation der 3'-Region zusammen mit prJN168
prJN153	atggacattaccggaaacg	Nachweis von <i>fogB</i>
prJN154	gaaagtcttcgggactctaac	
prJN155	gtcctgtaattttctccggg	Kontrolle der Deletion von <i>fogD</i> ; Amplifikation der 5'-Region zusammen mit prJN167
prJN156	tcccgagaatctcaagag	Kontrolle der Deletion von <i>fogD</i> ; Amplifikation der 3'-Region zusammen mit prJN168
prJN157	atgtctacgaaatttgctc	Nachweis von <i>fogD</i>
prJN158	tgtttttagtttcaataccag	
prJN159	acacaaaccgcagttgg	Kontrolle der Deletion von <i>fogF</i> ; Amplifikation der 5'-Region zusammen mit prJN167
prJN160	tttcgggatcactacttcg	Kontrolle der Deletion von <i>fogF</i> ; Amplifikation der 3'-Region zusammen mit prJN168
prJN161	atgcgcaggaacatcttg	Nachweis von <i>fogF</i>
prJN162	gtttgctccgatttggcc	
prJN163	cagcaccacgaacacc	Kontrolle der Deletion von <i>fogG</i> ; Amplifikation der 5'-Region zusammen mit prJN167
prJN164	gaaactcgaatgcaagagc	Kontrolle der Deletion von <i>fogG</i> ; Amplifikation der 3'-Region zusammen mit prJN168
prJN165	atggccgttacttttgacatc	Nachweis von <i>fogG</i>
prJN166	ttacttggtgaggctatcaataatctc	

Material und Methoden

prJN167	cactggtaactccacgg	Kontrolle von Gendeletionen; bindet im 5'-Teil von <i>Afp_{pyr}G</i> nach Außen gerichtet
prJN168	atcagtcctcctctcag	Kontrolle von Gendeletionen; bindet im 3'-Teil von <i>Afp_{pyr}G</i> nach Außen gerichtet
prJN169	tcacatgttcttctcgttatcccctgATAACGCCCGATT-CCGCCAC	Klonierung von pJN025; Amplifikation von 1200 bp 5' von <i>fogG</i> zusammen mit prJN140; Überhang zu <i>E. coli</i> ori/Amp ^R und <i>Afp_{pyr}G</i>
prJN170	gtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtTCGACGTCA-GGCACGAACTG	Klonierung von pJN025; Amplifikation von 1200 bp 3' von <i>fogF</i> zusammen mit prJN141; Überhang zu ScURA-CEN/ARS und <i>Afp_{pyr}G</i>
prJN171	atggctttacaaacgaccaatacatg	Nachweis von <i>fogH</i>
prJN172	gtatagatatccggacatgagttccg	
prJN200	tctgtcaagagtctcgtcaccg	Nachweis von <i>fogF</i> ; neu designt
prJN201	ccgacatacgggcgctattag	
prJN202	ctcacatgttcttctcgt-tatcccctgCCCCGTCTAGGCGACTCG	Klonierung von pJN031; Amplifikation von 1200 bp 5' von <i>fogA</i> ; Überhang zu <i>E. coli</i> ori/Amp ^R und <i>Afp_{pyr}G</i>
prJN203	acatatttcgtca-gacacagaataactctcCGACTCCAAGCCGACAACGC	
prJN204	cacgcatcagtcctcctctcagacagaatTATTTTTTCCTTGTAGACTCTAGTG	Klonierung von pJN031; Amplifikation von 1200 bp 3' von <i>fogA</i> ; Überhang zu ScURA-CEN/ARS und <i>Afp_{pyr}G</i>
prJN205	cgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtTTGCGCTTAGCT-GAAATG	
prJN207	actcttcaatcctatcacctcgctcaaaAT-GTCTACGAAATTTGCTCTTGTCAC	Klonierung von pJN032; Amplifikation von <i>fogD</i> + 500 bp 3' UTR; Überhang zu <i>alcA(P)</i> und <i>Afp_{pyr}G</i>
prJN208	acatatttcgtcagacacagaataactctcTCTTTGTTCTGCTCGATTGCAATG	
prJN209	actcttcaatcctatcacctcgctcaaaATGGCCGTTACTT-TTGACATCTCG	Klonierung von pJN033; Amplifikation von <i>fogG</i> + 500 bp 3' UTR; Überhang zu <i>alcA(P)</i> und <i>Afp_{pyr}G</i>
prJN210	acatatttcgtcagacacagaataactctcAGCCATCTATATT-CCCCGGTCGTC	
prJN216	gggagtgtcgacctgaaggac	Kontrolle der Deletion von <i>fogA</i> ; Amplifikation der 5'-Region zusammen mit prJN167
prJN228	gatgaggtggtgcattgcagg	Klonierung von pJN037; Amplifikation des <i>ech</i> -Clusters in 4 Fragmenten; Überhänge zu pYWB2 linearisiert mit BamHI
prJN229	ccagatcggaatctgtcggtg	
prJN230	atcaaagcgggatggacttcgc	
prJN231	agcccaaagatcactgtgtctg	
prJN232	gaagtgccgtgtatctctgcgtc	

prJN233	atttacagctcccgccacag	
prJN234	ggacttgactctccttctcctgatcggatcTCAATGCCCTTT- GGAAGCCGTG	
prJN235	caacaccatattttaatcccatgtgggatcTCCCCGAGCAT- GCGGTACC	
prJN245	ggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaATGCGCAG- GAACATCTTGAC	Klonierung von pJN040; Überhänge zu pET28a(+) linearisiert mit XbaI und HindIII
prJN246	cagtgggtgggtgggtgctcgagtgcggccgcCCCTGAC- CCCGGATACTCAG	
prJN249	gcactctggaaacgaactcc	Kontrolle der Deletion von <i>fogA</i> ; Amplifikation der 3'-Region zusam- men mit prJN168; bindet 3' vom wA- PKS downstream Bereich im <i>A. nidu- lans</i> Genom
prJN250	tactatacgggacagacgaaccgatgtgataattgaagttt- gaacatagatggaagg	Klonierung von pJN041; Amplifika- tion von <i>fog</i> -Cluster Fragment 3; zu- sammen mit prJN085
prJN251	ctatgttcaaactcaattatcacatgcggttcgtctgtcccg	Klonierung von pJN041; Amplifika- tion von <i>fog</i> -Cluster Fragment 4
prJN252	acatcacatttcccataatccatatTTTGACAGATAACTGCT- TACGAGCTG	
prJN253	agctcgtaaagcagttatctgtcaaaATATGGATTATGG- GAAATGTGATGTGG	Klonierung von pJN041; Amplifika- tion von <i>fog</i> -Cluster Fragment 5; zu- sammen mit prJN090
prJN254	gtgagcggataacaatttcacacagaattcATGCGCAG- GAACATCTTGAC	Klonierung von pJN042; Amplifika- tion von <i>fogF</i> von cDNA; Überhänge zu pQE-70 linearisiert mit EcoRI und BamHI
prJN255	gtgatggtgatggtgatgagatctggatccCCCTGACCCCG- GATACTCAG	
prJN257	actggtggacagcaaattgggtcgcggatcgATGCGCAG- GAACATCTTGAC	Klonierung von pJN044; Amplifika- tion von <i>fogF</i> von cDNA; Überhänge zu pET28a(+) linearisiert mit BamHI und Sall
prJN258	ggtggtggtgctcgagtgcggccgaagctTCACCCTGAC- CCCGGATACTCAG	
prJN273	ctcacatgttcttctcgtcttatcccctgGACGTTGAACAT- GCGCTG	Klonierung von pJN051; Amplifika- tion von 1200 bp 5' von <i>fogD</i> aus <i>A. nidulans</i> JN020 zusammen mit prJN140; Überhang zu <i>E. coli</i> ori/Amp ^R und <i>AfpyrG</i>
prJN274	cgtaatcatggtcatagctgttctctgtATAGCCTCT- GAAGCGTC	Klonierung von pJN051; Amplifika- tion von 1200 bp 3' von <i>fogD</i> aus <i>A. nidulans</i> JN020 zusammen mit prJN141; Überhang zu ScURA- CEN/ARS und <i>AfpyrG</i>
prJN277	agctaccccgttgagcagacatcaccggcATGCGCAG- GAACATCTTGAC	

Material und Methoden

prJN278	ctcaacaccatattttaatcccatgtgggcAGCATTT-CTCGTCTGCTGTG	Klonierung von pJN052; Amplifikation von <i>fogF</i> + 500 bp 3' UTR; Überhang zu pJN017 linearisiert mit SfoI
prJN280	ctcacatgttctttctgcgttatcccctgACCGAGTAGTACGGTGTACAG	Klonierung von pJN053; Amplifikation von 1200 bp 5' von <i>fogl</i> ; Überhang zu <i>E. coli</i> ori/Amp ^R und <i>Afp_{pyrG}</i>
prJN281	acatatttcgtcagacacagaataactctcTTCTTCGTTGGCTGTCAGGAAG	
prJN282	tcacgcatcagtgccctctctcagacagaatATT-TAAAACAGGGGACACGGG	Klonierung von pJN053; Amplifikation von 1200 bp 3' von <i>fogl</i> ; Überhang zu ScURA-CEN/ARS und <i>Afp_{pyrG}</i>
prJN283	cgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtGCAGCTATCTGTGACGGGTC	
prJN287	gtgatggtgatggtgatgagatctg-gatcTACTACTACGTCCTTCATAGTCCTTG	Nachweis von <i>fogC</i> ; Amplifikation von <i>fogC</i> von cDNA; Überhang zu pQE-70 linearisiert mit EcoRI und BamHI
prJN291	tgtgagcggataacaatttcacacagaattAT-GGCCGAACAAACCGAG	
prJN292	cacgcatcagtgccctctctcagacagaatACAATTACCTCAATTCTATGCACG	Klonierung von pJN060; Amplifikation von 1200 bp 3' von <i>fogB</i> ; Überhang zu ScURA-CEN/ARS und <i>Afp_{pyrG}</i>
prJN293	cgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtCACAAGAAGCTAGACATGGG	
prJN294	ctcacatgttctttctgcgt-tatcccctgGCCAAAGACATCTACTAAATGGAC	Klonierung von pJN061; Amplifikation von 1200 bp 5' von <i>fogC</i> ; Überhang zu <i>E. coli</i> ori/Amp ^R und <i>Afp_{pyrG}</i>
prJN295	acatatttcgtcagacacagaataactctcTTTGCTGTGTGT-CACGTC	
prJN311	agctaccccgttgagcagacatcaccggcATGTGG-GACTCCCGATTATTTTC	Klonierung von pJN068; Amplifikation von <i>echP450</i> + 500 bp 3' UTR; Überhang zu pJN017 linearisiert mit SfoI
prJN312	ctcaacaccatattttaatcccatgtgggcATGCACGACATT-CGATGGATTTC	
prJN332	aatactctgccaatggcatagggaaattgaACACAG-GAAACAGCTATGAC	Klonierung von pJN074; Amplifikation von pYWB2 mit prJN332 und prJN344, Amplifikation von EURHEDRAFT_528589 bis EURHEDRAFT_400000 in 3 Fragmenten mit prJN333 – prJN343
prJN333	cgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtTCAATTTCCCTATGCCATTGGCAG	
prJN334	tagttgaatatggtcaccagacgc	
prJN335	tatggttgcacccgtcatgctaac	
prJN336	ctcgtatatcgaaagtcggcctc	
prJN337	cttgccgaaaccggatttatctg	
prJN343	atatttcgtcagacacagaataactctcacgcgtGTGTAGTG-GATACTATCACCCATCC	
prJN344	cagtttggatgggtgatagtatccactacacACGCGT-GAGAGTTATTCTGTGTCTGACG	
prJN348	ttacaaccaccgatgttcac	Kontrolle zur Integration von pJN074 in <i>A. nidulans</i> JN019 Genom; bindet am Ende von EURHEDRAFT_528589; zusammen mit vwrBPT2-r2

vwRbPT2-f2	ctgcagcagccttaccacac	Amplifikation von <i>echPT2</i> ; Primer von Viola Wohlgemuth
vwRbPT2-r2	ccaagcttctaaaacaatgacatgtagatg	

3.2.6 Organismen

Tabelle 11: Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Organismus	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XLI-Blue	<i>endA1</i> <i>gyrA96</i> (nal ^R) <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> <i>glnV44</i> F'[::Tn10 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ (<i>lacZ</i>)M15] <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺)	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
<i>E. coli</i> XL10-Gold	<i>endA1</i> <i>glnV44</i> <i>recA1</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> <i>Hte</i> Δ (<i>mcrA</i>)183 Δ (<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)173 <i>tet</i> ^R F'[<i>proAB</i> <i>lacI</i> ^q Δ M15 Tn10(<i>Tet</i> ^R <i>Amy</i> <i>Cm</i> ^R)]	Agilent (Santa Clara, CA, USA)
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1</i> <i>glnV44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>gyrA96</i> <i>deoR</i> <i>nupG</i> Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B Derivat, F ⁻ <i>ompT</i> <i>lon</i> <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i>	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
<i>E. coli</i> M15	F ⁻ , Φ 80 <i>lacM15</i> , <i>thi</i> , <i>lac</i> ⁻ , <i>mtl</i> ⁻ , <i>recA</i> ⁺ , Km ^R	Qiagen (Hilden)
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> λ (DE3 [<i>lacI</i> <i>lacUV5</i> T7 gene 1 <i>ind1</i> <i>sam7</i> <i>nin5</i>]) pLysSRARE (Cam ^r)	Novagen (Merck, Darmstadt)

Tabelle 12: Verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Organismus	Genotyp	Referenz
<i>S. cerevisiae</i> HOD114-2B	<i>MATα</i> <i>ura3-52</i> <i>his3Δ1</i> <i>leu2-3112</i>	406
<i>S. cerevisiae</i> BJ5465-npgA	<i>MATα</i> <i>ura3-52</i> <i>leu2-Δ1</i> <i>trp1</i> <i>his3-Δ200</i> <i>pep4::HIS3</i> <i>prb1-Δ1.6R</i> <i>can1</i> <i>GAL</i> <i>npgA</i>	407

Tabelle 13: Verwendete *Aspergillus* Spezies und Stämme

Organismus	Genotyp	Referenz
<i>A. ruber</i> QEN-0407-G2	Wildtyp	aus Wurzeln von <i>Hibiscus tiliaceus</i> , China ⁶⁷
<i>A. ruber</i> NRRL 52	Wildtyp	ARS Culture Collection (NRRL) (USA)
<i>A. ruber</i> NRRL 65	Wildtyp	ARS Culture Collection (NRRL) (USA)
<i>A. ruber</i> NRRL 75	Wildtyp	ARS Culture Collection (NRRL) (USA)
<i>A. ruber</i> NRRL 76	Wildtyp	ARS Culture Collection (NRRL) (USA)

<i>A. cristatus</i> CGMCC 3.6083	Wildtyp	Chinese General Microbiological Culture Collection (China)
<i>A. glaucus</i> NRRL 116	Wildtyp	ARS Culture Collection (NRRL) (USA)
<i>A. nidulans</i> LO8030	<i>pyroA4, riboB2, AfpyrG89, nkuA::argB</i> , Deletion von BGCs: (AN7804-AN7825)Δ, (AN2545-AN2549)Δ, (AN1039-AN1029)Δ, (AN10023-AN10021)Δ, (AN8512-AN8520)Δ, (AN8379-AN8384)Δ, (AN9246-AN9259)Δ, (AN7906-AN7915)Δ, (AN6000-AN6002)Δ	408

Tabelle 14: *Aspergillus nidulans* Stämme entstanden während dieser Doktorarbeit

Stamm	Genotyp	Plasmid
JN001	<i>wA-PKS::gpdA(p)-fogA</i> + 500bp 3'UTR- <i>Afribo</i> in LO8030	pJN012
JN002	<i>wA-PKS::Afribo</i> in LO8030	pYWB2
JN004	<i>wA-PKS::fog-Cluster</i> (500 bp 3'UTR- <i>fogA</i> – <i>fogl</i> -500 bp 5'UTR)- <i>Afribo</i> in LO8030	pJN014
JN006	<i>fogH::AfpyrG</i> in JN004	pJN019
JN007	<i>fogE::AfpyrG</i> in JN004	pJN020
JN009	<i>fogD::AfpyrG</i> in JN004	pJN022
JN010	<i>fogF::AfpyrG</i> in JN004	pJN023
JN012	<i>wA-PKS::gpdA(p)-fog-Cluster</i> (<i>gpdA(p)-fogl</i> – <i>fogA</i> -500 bp 3'UTR- <i>Afribo</i>) in LO8030	pJN018
JN013	<i>fogG::AfpyrG</i> in JN004	pJN025
JN015	<i>fogA::AfpyrG</i> in JN004	pJN031
JN019	<i>wA-PKS::ech-Cluster</i> essenzielle Gene (500 bp 5'UTR-EURHEDRAFT_448612 – EURHEDRAFT_448141-500 bp 3'UTR)- <i>Afribo</i> in LO8030	pJN037
JN020	<i>wA-PKS::fog-Cluster</i> (500 bp 3'UTR- <i>fogA</i> – <i>fogD, fogI</i> -500 bp 5'UTR)- <i>Afribo</i> ohne <i>fogEFH</i> in LO8030	pJN041
JN025	<i>wA-PKS::gpdA(p)-fogF</i> -500bp 3'UTR- <i>Afribo</i> in LO8030	pJN052
JN029	<i>fogG::AfpyrG</i> in JN020	pJN051
JN033	<i>fogl::AfpyrG</i> in JN004	pJN053
JN034	<i>fogB::AfpyrG</i> in JN004	pJN060
JN035	<i>fogC::AfpyrG</i> in JN004	pJN061
JN042	<i>wA-PKS::gpdA(p)-echP450</i> -500bp 3'UTR- <i>Afribo</i> in LO8030	pJN068
JN044	<i>Afribo::1506 bp 3' von EURHEDRAFT_528589 – EURHEDRAFT_400000-500 bp 3'UTR-AfpyrG</i>	pJN074

3.3 Nährmedien und Supplementlösungen

Sofern nicht anders angegeben wurden die Medien und Lösungen autoklaviert. Für die Herstellung von Festmedien wurden 1,5 – 2 % (w/v) Agar-Agar zugegeben. Hitzelabile Lösungen oder Medienbestandteile wurden steril filtriert (Spritzenfilter Filtropur S 0.2, Porengröße 0,2 µm, Sarstedt, Nümbrecht) und nach dem Autoklavieren zugesetzt. Größere Volumina hitzeempfindlicher Lösungen wurden durch eine Steritop-GP Polyethersulfon Membranfiltereinheit (Porengröße 0,22 µm, Merck Milipore, Darmstadt), angeschlossen an eine Membranpumpe, gefiltert.

3.3.1 Nährmedien für *Escherichia coli*

Tabelle 15: LB Medium (*lysogeny broth*)

Bestandteil	Menge
Trypton	10 g L ⁻¹
NaCl	10 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5 g L ⁻¹

Tabelle 16: SOB Medium (*super optimal broth*)

Bestandteil	Menge
Trypton	20 g L ⁻¹ (w/v)
Hefeextrakt	5 g L ⁻¹ (w/v)
NaCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
KCl	2,5 mM
MgSO ₄	10 mM

Der pH wurde auf $7 \pm 0,2$ eingestellt. Das MgCl₂ und MgSO₄ wurde aus 1 M steril gefilterten Stock-Lösungen nach dem Autoklavieren zugegeben. Für SOC-Medium wurden zusätzlich 20 ml einer sterilen 1 M Glukoselösung (20 mM) zugesetzt.

Tabelle 17: TB Medium (*terrific broth*)

Bestandteil	Menge
Trypton	24 g L ⁻¹ (w/v)
Hefeextrakt	20 g L ⁻¹ (w/v)
Glycerin (99,5 %)	4 ml L ⁻¹ (v/v)

Die Medienbestandteile wurden in 900 ml vollentsalztem Wasser gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 100 ml Kaliumphosphatpuffer zugesetzt.

Tabelle 18: Kaliumphosphatpuffer

Bestandteil	Menge
KH ₂ PO ₄	0,17 M
K ₂ HPO ₄	0,72 M

Der Kaliumphosphatpuffer wurde zur Sterilisierung gefiltert.

3.3.2 Nährmedien für die Kultivierung von Ascomyceten

Tabelle 19: GMM (Glukose Minimal Medium)

Bestandteil	Menge
Nitratsalze (20x)	50 ml L ⁻¹ (v/v)
Spurenelemente	1 ml L ⁻¹ (v/v)
Glukose	10 g L ⁻¹ (w/v)

Der pH wurde auf $6,5 \pm 0,2$ eingestellt. Die Spurenelemente (Tabelle 31) wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt. Zur Selektion wurden je nach auf dem Plasmid kodierten Marker Pyridoxin, Riboflavin, Uracil oder Uridin zugegeben oder ausgelassen (Tabelle 32).

Tabelle 20: SMM (Stabilisiertes Minimal Medium)

Bestandteil	Menge
Nitratsalze (20x)	50 ml L ⁻¹ (v/v)
Spurenelemente	1 ml L ⁻¹ (v/v)
Glukose	10 g L ⁻¹ (w/v)
Sorbitol	1,2 M

Der pH wurde auf $6,5 \pm 0,2$ eingestellt. Die Spurenelemente (Tabelle 31) wurden nach dem Autoklavieren zugesetzt. Zur Selektion wurden je nach auf dem Plasmid kodierten Marker Pyridoxin, Riboflavin, Uracil oder Uridin zugegeben oder ausgelassen (Tabelle 32). Für das Bottom-Medium wurden 16 g L⁻¹ Agar-Agar und für das Top-Medium 7,5 g L⁻¹ Agar-Agar zugegeben.

Tabelle 21: PD Medium (Potato Dextrose)

Bestandteil	Menge
<i>potato dextrose broth</i> (Fertigmix von Sigma Aldrich, Steinheim)	24 g L ⁻¹ (w/v)

Um die Sporulierung von *A. ruber* QEN-0407-G2 anzuregen wurden dem Medium 1,7 – 3,4 % NaCl zugesetzt, dabei musste für das Festmedium der Agar-Agar Gehalt auf 3 % (w/v) erhöht werden.

Tabelle 22: YM Medium (Yeast extract - Malt extract)

Bestandteil	Menge
Hefeextrakt	3 g L ⁻¹ (w/v)
Malzextrakt	3 g L ⁻¹ (w/v)
Glukose	10 g L ⁻¹ (w/v)
Pepton	5 g L ⁻¹ (w/v)

Der pH wurde auf $6,2 \pm 0,2$ eingestellt.

Tabelle 23: ME20S Medium (Malzextrakt Saccharose)

Bestandteil	Menge
Malzextrakt	30 g L ⁻¹ (w/v)
Pepton	5 g L ⁻¹ (w/v)
Saccharose	200 g L ⁻¹ (w/v)

Der pH wurde auf $5,4 \pm 0,2$ eingestellt.

Tabelle 24: G22 Medium

Bestandteil	Menge
Pepton	5 g L ⁻¹ (w/v)
Glukose	10 g L ⁻¹ (w/v)
KH ₂ PO ₄	1 g L ⁻¹ (w/v)
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹ (w/v)
Glycerin	220 g L ⁻¹ (w/v)

Der pH wurde auf $5,6 \pm 0,2$ eingestellt. Für Festmedium wurden 2,5 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

Tabelle 25: Czapek-Dox Medium nach Sigma

Bestandteil	Menge
Na ₂ NO ₃	3 g L ⁻¹ (w/v)
KCl	0,5 g L ⁻¹ (w/v)
K ₂ HPO ₄	1 g L ⁻¹ (w/v)
Fe(II)SO ₄ *7H ₂ O	0,01 g L ⁻¹ (w/v)
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹ (w/v)
Saccharose	30 g L ⁻¹ (w/v)

Der pH wurde auf $7,3 \pm 0,2$ eingestellt.

Tabelle 26: Reis Medium

Bestandteil	Menge
Alnatura Naturreis Langkorn	40 % (w/w)
Wasser	60 % (w/w)

Zur Selektion wurden je nach auf dem Plasmid kodierten Marker Hefeextrakt (enthält Pyridoxin und ist hitzestabil), Riboflavin, Uracil oder Uridin (Tabelle 32) im Wasser gelöst, bevor es zum Reis gegeben wurde.

3.3.3 Nährmedien zur Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Medien für *S. cerevisiae* wurden zunächst in 90 % (v/v) ihres Endvolumens gelöst und autoklaviert. Nach dem Sterilisieren wurden die restlichen 10 % (v/v) als 20 %ige (w/v) Glukoselösung zugegeben. Zur Induktion des Gal1/10-Promotors wurde die Glukoselösung vollständig oder teilweise durch Galaktoselösung ersetzt.

Tabelle 27: YPD Medium (*Yeast extract Peptone Dextrose*)

Bestandteil	Menge
Hefeextrakt	10 g L ⁻¹ (w/v)
Pepton	20 g L ⁻¹ (w/v)
Glukose	20 g L ⁻¹ (w/v)

Tabelle 28: SC Medium (*Synthetic Complete*)

Bestandteil	Menge
Hefe-Stickstoff-Basis mit NH ₄ SO ₄ ohne Aminosäuren (Sigma-Aldrich, Steinheim)	6,7 % (w/v)
CSM-His-Leu-Ura (MP Biomedicals™, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	0,069 % (w/v)
Glukose	2 % (w/v)
L-Histidin	20 mg (w/v)
L-Leucin	60 mg (w/v)
Uracil	20 mg (w/v)

Für die Selektion wurde je nach dem Plasmid-kodiertem Marker entweder Histidin, Leucin oder Uracil ausgelassen. Der pH wurde auf $6,2 \pm 0,2$ eingestellt.

3.3.4 Antibiotika

Die Antibiotika wurden als Stammlösung angesetzt, steril filtriert und vor dem Inokulieren den Medien zugegeben. Vor der Zugabe wurden die Medien auf <50°C abgekühlt.

Tabelle 29: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung (Lsgmittel)	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg ml ⁻¹ (ddH ₂ O)	100 µg ml ⁻¹
Carbenicillin	100 mg ml ⁻¹ (ddH ₂ O)	100 µg ml ⁻¹
Chloramphenicol	30 mg ml ⁻¹ (Ethanol)	30 µg ml ⁻¹
Kanamycin	50 mg ml ⁻¹ (ddH ₂ O)	50 µg ml ⁻¹
Tetracyclin	50 mg ml ⁻¹ (Ethanol)	20 µg ml ⁻¹

3.3.5 Supplementlösungen und Auxotrophiemarker

Tabelle 30: Nitratsalze (20x)

Bestandteil	Menge
NaNO ₃	120 g L ⁻¹
KCl	10,4 g L ⁻¹
MgSO ₄ *7H ₂ O	10,4 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	30,4 g L ⁻¹

autoklaviert

Tabelle 31: Spurenelemente

Bestandteil	Menge (für 100 ml)
ZnSO ₄ *7H ₂ O	2,2 g
H ₃ BO ₃	1,1 g
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,16 g
CoCl ₂ *5H ₂ O	0,16 g
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,16 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *7H ₂ O	0,11 g
Na ₄ EDTA	5 g

Die Bestandteile wurden in abgebildeter Reihenfolge in 80 ml ddH₂O bis zum Farbumschlag unter Rühren gelöst, anschließend auf 100 ml aufgefüllt, zum vollständigen Lösen ggf. KOH zugegeben. Die Lösung wurde autoklaviert.

Tabelle 32: Verwendete Auxotrophiemarker

Auxotrophiemarker	Endkonzentration im Medium
Pyridoxin	0,5 mg ml ⁻¹
Riboflavin	2,5 µg ml ⁻¹
Uracil	1 mg ml ⁻¹
Uridin	0,5 mg ml ⁻¹

3.4 Kultivierung von Mikroorganismen

3.4.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde als Flüssigkultur in LB Medium (Tabelle 15) inkubiert. Für die Selektion wurde zusätzlich Antibiotikum in adäquater Menge (Tabelle 29) hinzugegeben. Die Kulturen wurden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Anzucht auf Nährböden erfolgte über Nacht bei 37°C oder über 2 Tage bei 30°C.

3.4.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae wurde grundsätzlich auf YPD Festmedium (Tabelle 27) bei 30°C für zwei bis drei Tage kultiviert. Selektion erfolgte auf SC-X Medium (Tabelle 28; X steht für den jeweiligen Auxotrophie-marker, der nicht im Medium enthalten ist) bei 30°C für drei bis vier Tage. Kultivierung in YPD oder SC-X Flüssigmedium erfolgte bei 30°C schüttelnd mit 230 rpm.

3.4.3 Kultivierung von *Aspergillus ruber*, *Aspergillus glaucus* und *Aspergillus cristatus*

Die Pilze wurden hauptsächlich auf PD+NaCl (Tabelle 21) Festmedium oder GMM (Tabelle 19) bei 25°C für fünf bis sieben Tage im Dunkeln inkubiert. In flüssigem PD+NaCl oder GMM erfolgte die Kultivierung bei 25°C schüttelnd mit 230 rpm für bis zu 28 Tage. Für die Untersuchung des Sekundärmetabolitprofils erfolgte die Kultivierung unter Lichtausschluss hauptsächlich bei 25°C für bis zu 28 Tage auf Reismedium. Alternativ wurden die Pilze auf YM, ME20S, G22 und Czapek-Dox (Tabelle 22 - Tabelle 25) bei 25° sowohl als Oberflächenkultur als auch schüttelnd bei 230 rpm für bis zu 28 Tage im Dunkeln inkubiert.

3.4.4 Kultivierung von *Aspergillus nidulans*

A. nidulans wurde auf GMM (Tabelle 19) oder Reis (Tabelle 26) nach Zugabe der benötigten Auxotrophiemarker (Tabelle 32) bei 37°C unter Lichtausschluss für bis zu drei bzw. 14 Tage kultiviert. Inkubation in Flüssigmedium erfolgte im Dunkeln bei 37°C schüttelnd mit 230 rpm.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Ascomyceten

Das Mycel einer 5 – 6 Tage alten Schüttelkultur wurde mit Hilfe einer Nutsche vom Medium befreit und zweimal mit kaltem 1x PBS (Tabelle 33) gewaschen. Nach Auspressen der restlichen Flüssigkeit auf einem saugfähigen Papier wurde das Mycel unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser tiefgefroren und pulverisiert. Pro 100 mg pulverisiertem Mycel wurden 1,2 ml Digestion Puffer (Tabelle 34) mit Proteinase K (0,1 mg ml⁻¹) zugegeben und für 2 h bei 50°C und 160 rpm inkubiert. Danach wurde ein Volumenanteil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI; 25:24:1) zugeführt, das Reaktionsgefäß für 10 min invertiert und für 7 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 5 ml PCI versetzt, erneut für 10 min invertiert und wie zuvor zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zugabe von 10⁻¹ Volumen kaltem Natriumacetat (3 M; pH 5,2) und 1 Volumenanteil Isopropanol wurde die DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die DNA bei 4°C mit 6000 rpm für 45 min abzentrifugiert und mit zweimal je 3 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen wurde sie für 30 min bei 50°C getrocknet und in 300 µl ddH₂O aufgenommen. Die DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese auf ihre Reinheit kontrolliert und bei -20°C gelagert. Wenn notwendig, wurde restliche RNA durch Zugabe von RNase I (Roth, Karlsruhe) nach Herstellerangaben verdaut und die DNA durch erneute Fällung mit Natriumacetat und Isopropanol gereinigt.

Tabelle 33: 10x PBS (Phosphate Buffered Saline)

Bestandteil	Menge
NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

Der pH des Puffers wurde auf 7,4 eingestellt.

Tabelle 34: DB (Digestion Buffer)

Bestandteil	Menge
NaCl	100 mM
Tris	10 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5 % (w/v)

Der pH des Puffers wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt. Direkt vor Gebrauch wurden 0,1 mg ml⁻¹ Proteinase K (Roth, Karlsruhe) zugegeben.

3.5.2 Schnelle Isolierung geringer Mengen chromosomaler DNA aus *A. nidulans*

Zur Überprüfung genetisch modifizierter Stämme von *A. nidulans* via PCR wurden geringe Mengen gDNA mit der folgenden Methode isoliert. Der Pilz wurde über Nacht bei 37°C in 0,5 ml GMM Flüssigmedium innerhalb eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes angezogen. Das Mycel wurde durch Pressen auf ein saugfähiges Papier leicht getrocknet und in 400 µl LETS Lösung (Tabelle 35) überführt. Nach Zugabe einer Spatelspitze 0,25 – 0,5 mm und vier 2,85 – 3,45 mm Glasperlen (Roth, Karlsruhe) in das Schraubdeckelröhrchen wurde das Mycel in einem Minilys Homogenisator für 200 Sekunden mit maximaler Geschwindigkeit zerstört. Nach der Zugabe von weiteren 300 µl LETS Lösung und 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die Probe für 1 min geschüttelt. Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl kaltem Ethanol gemischt. Die DNA wurde mit 13000 rpm für 20 min abzentrifugiert und mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 13000 rpm für 5 min wurde sie für 20 min bei 55°C getrocknet und anschließend in 50 µl ddH₂O gelöst.

Tabelle 35: LETS-Lösung

Bestandteil	Menge
LiCl	0,1 M
EDTA	20 mM
Tris	10 mM
SDS	0,5 % (w/v)

Der pH wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

3.5.3 Isolierung von mRNA aus *A. ruber* und cDNA-Synthese

A. ruber QEN-0407-G2 wurde in einer PDB Schüttelkultur bei 25°C und 230 rpm für zwei Wochen angezogen. Mit einer Nutsche wurde das Mycel vom Medium separiert. Das Mycel wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser pulverisiert. Daraus wurde die gesamte mRNA mit Hilfe des E.Z.N.A.® Fungal RNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA) nach Herstellerangaben isoliert. Über die mRNA wurde *via* des ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) die cDNA synthetisiert.

3.5.4 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* erfolgte in modifizierter Form nach ⁴⁰⁹. Dabei wurden 5 ml LB Medium (Tabelle 15) mit einer Einzelkolonie des jeweiligen *E. coli* Stammes inokuliert und über Nacht bei 37°C und 230 rpm im Schüttler als Vorkultur inkubiert. Damit wurden 200 ml SOB Medium (Tabelle 16) auf eine OD₆₀₀ von 0,1 beimpft. Die Hauptkultur wurde bei Raumtemperatur (~23°C) schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,6 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis gekühlt und durch zentrifugieren bei 2500 x *g* für 8 min und 4°C geerntet. Die abzentrifugierten Bakterien wurden in 25 ml eisgekühltem Transformationspuffer (Tabelle 36) resuspendiert und abermals für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (2500 x *g*, 8 min, 4°C) und erneutes Resuspendieren in 20 ml Transformationspuffer. Zu den Zellen wurden 7 % (v/v) (1,4 ml) DMSO hinzugegeben und nach leichtem Schwenken wurden sie für 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in Aliquots á 100 µl unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Tabelle 36: Transformationspuffer

Bestandteil	Konzentration
PIPES	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
MnCl ₂	55 mM

Das Manganchlorid wurde erst nach Einstellen des pH auf 6,7 zugegeben und gelöst. Der Puffer wurde steril filtriert.

3.5.5 Transformation chemisch-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Tiefgefrorene transformationskompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Maximal 10 µl des Plasmids oder DNA-Gemisches wurden hinzugegeben, leicht mit den Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein 45-sekündiger Hitzeschock bei 42°C, gefolgt von einer Inkubation auf Eis für 5 min. Es wurden 450 µl steriles SOC Medium (Tabelle 16) hinzugegeben und die Kultur zur Regeneration bei 37°C für 1 h in einem Thermomixer mit 900 rpm inkubiert. Nach der Regenerationszeit wurden die Bakterien auf LB Medium mit selektierenden Antibiotika ausplattiert und bei 37°C bebrütet.

3.5.6 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* nach der LiOAc-Methode

50 ml YPD Medium (Tabelle 27) wurden mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,3 inokuliert und bei 30°C schüttelnd mit 230 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ zwischen 1,2 – 1,5 erreicht wurde. Die Zellen wurden bei 3000 rpm für 3 min und 4°C geerntet. Das entstandene Zellpellet wurde in 25 ml sterilem, kaltem H₂O gewaschen und anschließend wieder abzentrifugiert. Die Hefezellen wurden in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Zellpellet in 400 µl 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden wieder zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Auf die Zellen wurden nacheinander 240 µl 50 % PEG4000, 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl DNA aus Heringssperma (Carrier-DNA) und maximal 50 µl der DNA gegeben. Das Pellet wurde in diesem Mix resuspendiert und anschließend für 30 min bei 30°C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation für 20 min bei 42°C. Nach Zentrifugation bei 3000 rpm für 3 min wurden die Hefezellen auf SC-X (Tabelle 28) Festmedium ausplattiert und bei 30°C für 3 – 4 Tage inkubiert.

3.5.7 Transformation von *Aspergillus nidulans*

Die genetische Modifikation von *A. nidulans* erfolgte in leicht modifizierter Form über die PEG-vermittelte Protoplastentransformation wie beschrieben in ⁴⁰⁵.

Frisch hergestellte *A. nidulans*-Sporensuspension von zwei Platten GMM wurden benutzt um 30 ml (in einem 100 ml Erlenmeyerkolben) GMM Flüssigmedium (Tabelle 19 + Auxotrophiemarker + 30 mg Hefeextrakt) anzuimpfen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C schüttelnd mit 230 rpm bis die Keimschläuche ungefähr die doppelte bzw. dreifache Länge des Sporendurchmessers erreichten (~5 h). Die Keimlinge wurden bei 5000 rpm für 5 min abzentrifugiert und mit 30 ml sterilem ddH₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Keimlinge in 10 ml osmotisches Medium (Tabelle 37; in einem 50 ml Erlenmeyerkolben) mit 50 mg *lysing enzymes* aus *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 20 mg Yatalase (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) überführt. Der Verdau der Zellwand erfolgte bei 37°C schüttelnd mit 100 rpm für 3 h. Der Status der Protoplastierung wurde kontinuierlich mit dem Mikroskop verfolgt. Nach dem Zellwandverdau wurde die Protoplastensuspension in einem 50 ml Reaktionsröhrchen langsam mit 10 ml Trapping-Puffer (Tabelle 38) überschichtet. Durch Zentrifugation mit verlangsamer Beschleunigung und Bremse bei 5000 rpm für 15 min akkumulierten die Protoplasten an der Interphase zwischen Trapping-Puffer und osmotischem Medium. Die Protoplasten wurden mit einer Pipette mit abgeschnittener Spitze in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt und durch Invertieren mit 10 ml STC-Puffer (Tabelle 39) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 5000 rpm für 7 min wurden die Protoplasten in 400 µl STC-Puffer resuspendiert und für die Transformation à 100 µl Aliquots in neue 15 ml Reaktionsröhrchen verteilt.

Die DNA für die Transformation wurde zuvor in STC-Puffer rückgelöst und mit maximal 15 µl zu 100 µl der Protoplastensuspension gegeben. Nach leichtem Mischen wurde der Protoplasten-DNA Mix für 50 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 1,25 ml PEG-Lösung (Tabelle 40) zugegeben und mit den Protoplasten durch vorsichtiges Rollen des Röhrchens vermischt. Der Transformationsansatz wurde für 20 min bei Raumtemperatur (~23°C) inkubiert, bevor er mit 7 ml STC-Puffer versetzt und gemischt

wurde. Dieser Mix wurde auf vier Platten SMM-Bottom Agar (Tabelle 20; ohne den jeweiligen Auxotrophiemarker) aufgeteilt und mit 5 – 7 ml handwarmen flüssigen SMM-Top Agar durch Schwenken der Platten gemischt. Die Platten wurden nach Abkühlen bei 37°C für eine Nacht aufrecht (Agarseite unten) inkubiert, bevor sie gedreht (Agarseite oben) und für weitere 2 – 3 Tage bebrütet wurden.

Tabelle 37: Osmotisches Medium

Bestandteil	Konzentration
MgSO ₄	1,2 M
Na-Phosphat Puffer	10 mM

Der pH des Na-Phosphat Puffers wurde mit Na₂HPO₄ auf 5,8 eingestellt; steril filtriert

Tabelle 38: Trapping-Puffer

Bestandteil	Konzentration
Sorbitol	0,6 M
Tris	0,1 M

Der pH des Tris-Puffers wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt; autoklaviert

Tabelle 39: STC-Puffer

Bestandteil	Konzentration
Sorbitol	1,2 M
CaCl ₂	10 mM
Tris	10 mM

Der pH des Tris-Puffers wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt; autoklaviert

Tabelle 40: PEG-Lösung

Bestandteil	Konzentration
PEG 4000	60 % (w/v)
CaCl ₂	50 mM
Tris	50 mM

Der pH des Tris-Puffers wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt; autoklaviert

3.5.8 Transformation von *Aspergillus ruber*

Die Transformation von *A. ruber* QEN-0407-G2 erfolgte wie für *A. nidulans* beschrieben, jedoch unterschieden sich die folgenden Parameter:

Die Keimung der Konidiosporen erfolgte in PDB mit 1,7 % (w/v) NaCl bei 25°C schüttelnd mit 230 rpm für ca. 11,5 h. Zum Verdau der Zellwand wurden 100 mg Yatalase und 50 mg *lysing enzymes* von *T. harzianum* im osmotischen Medium gelöst. Für den Verdau wurde die Suspension bei 25°C schüttelnd mit 100 rpm für 3,5 – 4 h inkubiert. Als Selektivmedium nach der Transformation diente PDA (Tabelle 21) mit 218,6 g L⁻¹ Sorbitol und 200 µg ml⁻¹ Hygromycin B im Bottom-Medium, das Top-Medium enthielt nur 100 µg ml⁻¹ Hygromycin B. Die Platten wurden bei 25°C für bis zu 8 Tage inkubiert.

3.5.9 Reinigung und Konzentration von DNA mittels Ethanol-Präzipitation

Der DNA-Lösung wurde ein Zehntel ihres Volumens Natriumacetat (3 M; pH 5,2) und 2,5 Volumen kaltes Ethanol zugesetzt. Dieser Ansatz wurde gemischt und für mindestens eine Stunde bei -20°C inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde bei 13000 rpm für 20 min abzentrifugiert und mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Es wurde wieder mit 13000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die DNA bei 55°C getrocknet. Die DNA wurde in ddH₂O gelöst.

3.5.10 Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung und Sequenzierung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung wurde das NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer nach Herstellerangaben verwendet. Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten oder Plasmiden wurden von den Firmen Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen) oder Eurofins Genomics (Ebersberg) durchgeführt.

3.5.11 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung des Gels wurde 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (Tabelle 41) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf <50°C wurden der Agaroselösung 1x Invitrogen™ SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zugesetzt und das Gemisch in einen Schlitten gegossen in dem mit Hilfe eines Teflonkammes Taschen gebildet wurden. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Gelkammer gegeben, die mit 1x TAE-Puffer gefüllt war und der Probenkamm wurde entfernt. Bis zu 12 µl der DNA-Proben, die zuvor mit 1x TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vermischt wurden, wurden in die Taschen aufgetragen. Als Marker diente, sofern nicht anders erwähnt, der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Für 25 min wurde eine Spannung von 130 V angelegt. Mit Hilfe von UV-Licht der Wellenlänge 312 nm konnte die DNA in einer Geldokumentationsanlage detektiert werden.

Tabelle 41: 50x TAE-Puffer

Bestandteil	Menge
Tris	2 M
Essigsäure 96 %	400 mM
EDTA	50 mM

Der pH wurde mit Essigsäure auf 8,0 eingestellt.

3.5.12 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse wurden 5 ml LB + selektierendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie inokuliert. Die Kultur wurde bei 37°C mit 230 rpm schüttelnd über Nacht inkubiert. Von der Kultur wurden 2 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 17000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde restlos verworfen und das Bakterienpellet wurde in 250 µl Lösung I (Tabelle 42) resuspendiert. Es wurden 250 µl Lösung II (Tabelle 43) zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren vorsichtig vermischt. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur

(~23°C) wurden dem Ansatz 250 µl Kaliumacetat (3 M; pH 4,8) beigefügt und durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden die lysierten Zellen für 10 min bei 17000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und, wie zuvor, erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl kaltem Isopropanol vermischt. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 17000 x *g* und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen bevor es im Heizblock bei 55°C getrocknet wurde. Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in 50 µl ddH₂O gelöst.

Tabelle 42: Lösung I - Plasmidisolierung

Bestandteil	Menge
Tris	50 mM
EDTA	10 mM
RNase I	10 µg ml ⁻¹

Der pH des Tris-Puffers wurde auf 8,0 eingestellt. Die RNase I wurde erst kurz vor dem Gebrauch zugegeben.

Tabelle 43: Lösung II - Plasmidisolierung

Bestandteil	Menge
NaOH	0,2 M
SDS	1 % (w/v)

3.5.13 Plasmidisolierung aus *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Isolierung eines Plasmids aus *S. cerevisiae* mittels alkalischer Lyse wurden 8 ml SC-X (Tabelle 28) mit einer Einzelkolonie inokuliert. Die Kultur wurde bei 30°C mit 230 rpm schüttelnd für bis zu 24 h inkubiert. Die komplette Kultur wurde für 1 min bei 17000 x *g* abzentrifugiert. Der Überstand wurde restlos verworfen und die Hefezellen in 500 µl Lösung I (Tabelle 42) resuspendiert. Dieser Suspension wurden 5 µl 1 M DTT und 20 µl Zymolyase 100T (12,5 mg ml⁻¹; Zymo Research Europe, Freiburg) zugegeben. Die Suspension wurde auf einem Thermomixer für 3,5 h bei 37°C und 900 rpm inkubiert. Nach Überführung in ein Schraubdeckelröhrchen und Zugabe einer Spatelspitze 0,25 – 0,5 mm und vier 2,85 – 3,45 mm Glasperlen (Roth, Karlsruhe) wurden die Zellen mit einem Minilys Homogenisator für 200 sec bei maximaler Leistung zerstört. Von den aufgeschlossenen Zellen wurden 300 µl in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 300 µl Lösung II (Tabelle 43) wurde der Mix für 5 min bei Raumtemperatur (~23°C) inkubiert. 300 µl Kaliumacetat (3 M; pH 4,8) wurden hinzugegeben und die Suspension wurde gründlich gemischt. Die lysierten Zellen wurden für 10 min bei 17000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µl kaltem Isopropanol vermischt. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 17000 x *g* und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, bevor es im Heizblock bei 55°C getrocknet wurde. Die getrocknete Plasmid-DNA wurde in 10 µl ddH₂O gelöst. 8 µl davon dienten direkt der Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli*.

3.5.14 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Verdau von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken erfolgte im 15 µl Maßstab, während ein präparativer Verdau in Ansätzen von 50 µl mit erhöhter Inkubationszeit (je nach DNA-Menge bis zu 16 h) durchgeführt wurde. Restriktionsenzyme verschiedener Firmen (Enzyme) wurden mit den mitgelieferten Puffern nach Herstellerangaben verwendet. Analytische Restriktionsansätze wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert, für die nachfolgende Verwendung von präparativen Restriktionsverdaus wurde die DNA entweder dephosphoryliert oder direkt via Ethanol-Präzipitation gereinigt.

3.5.15 Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

Zur Minimierung religierter DNA nach einem Restriktionsverdau wurden dem Restriktionsverdau 2 µl Shrimp Alkalische Phosphatase (rSAP; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels Ethanol-Präzipitation gereinigt.

3.5.16 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte durch Polymerase-Kettenreaktion nach ⁴¹⁰. Als Matrizen-DNA diente genomische DNA, cDNA oder diverse Plasmide. Der Standardansatz basierte größtenteils auf dem Protokoll für die Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Analytische Reaktionen wurden in einem 25 µl Ansatz durchgeführt während präparative Ansätze in einem 50 µl Maßstab erfolgten.

Je nach Schwierigkeit der PCR wurde die Menge an Template DNA oder DMSO angepasst. Sehr oft erbrachte die Reaktion mit der errechneten Annealing-Temperatur der Primer kein positives Ergebnis, deswegen musste die optimale Annealing-Temperatur von Primerpaaren über eine Gradienten-PCR (gleiche Reaktionsansätze durchlaufen Zyklus mit unterschiedlicher Annealing-Temperatur) bestimmt werden. Für die erste PCR mit einem Primerpaar wurde die Annealing-Temperatur so gewählt, dass sie 1°C unter dem Primer mit der niedrigsten errechneten Temperatur lag oder mit ihr identisch war.

Tabelle 44: Standard-PCR Ansatz (50 µl) mit der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase

Bestandteil	Menge
Template DNA	gDNA/cDNA
	250 ng
	Plasmid-DNA
	75 ng
Reaktionspuffer	einfach konzentriert
Primer 1	0,5 µM
Primer 2	0,5 µM
dNTP Mix	200 µM
DMSO	3 % (v/v)
Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase	2 U

Tabelle 45: Thermoprofil für eine PCR mit der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
1 Initiale Denaturierung	98°C	30 sec	-
2 Denaturierung	98°C	15 sec	Anfang
3 Annealing	55°C – 72°C	30 sec	
4 Elongation	72°C	30 sec kbp ⁻¹	Zurück zu Schritt 2; 34x
5 Finale Elongation	72°C	300	-
6 Storage	4°C	∞	∞

3.5.17 Klonierung von Plasmiden via Homologer Rekombination (HR)

Die Klonierung von Plasmiden erfolgte über homologe Rekombination (HR) in *E. coli* oder *S. cerevisiae* nach ¹⁸⁹ und ¹⁹⁰. Zur Klonierung von einem Fragment in einen Vektor wurde die HR in *E. coli* durchgeführt, für zwei oder mehr Fragmente wurde *S. cerevisiae* benutzt.

Die DNA-Fragmente wurden via PCR mit einem >25 bp Überhang zum benachbarten Fragment bzw. linearisierten Vektor versehen. Nach Transformation von *E. coli* oder *S. cerevisiae* mit diesen Fragmenten (250 – 600 ng) und dem linearisierten Vektor (100 – 300 ng) erfolgte in den Organismen die Verknüpfung der Fragmente mit dem Vektor über homologe Rekombination. Durch Verwendung von Medien mit relevanten Antibiotika oder ohne die jeweiligen Auxotrophiemarker wurde auf die Anwesenheit des vollständigen Plasmids selektiert. Nach HR in *S. cerevisiae* wurden keine Einzelklone auf die Richtigkeit ihres Plasmids überprüft, vielmehr wurden alle Kolonien mit 4 ml SC-X von der Platte gespült und daraus eine 8 ml SC-X Kultur für die Plasmidisolierung inokuliert. Die aus Hefe isolierten Plasmide wurden direkt für die Transformation von *E. coli* benutzt. Einzelkolonien dieser transformierten *E. coli* wurden daraufhin auf positive Plasmide untersucht.

3.6 Proteinanalytische und -biochemische Methoden

3.6.1 *E. coli*-Zellaufschluss über Ultraschall

E. coli Zellen wurden in 2,5x Volumen Lysepuffer (Tabelle 46) resuspendiert. Zur Unterstützung des Zellaufschlusses wurden der Suspension 0,05 mg ml⁻¹ Lysozym (Roth, Karlsruhe) und DNase I (Roth, Karlsruhe) hinzugegeben, durch Invertieren gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zelllyse erfolgte *via* Ultraschall über einem Sonifier mit 60 % Pulsdauer, einer 50 % Amplitude für jeweils eine Minute Puls und einer Minute Abkühlzeit. Dieser Zyklus wurde mindestens zehn Mal wiederholt. Der Zellrohextrakt wurde anschließend bei 17000 x g für 45 min zentrifugiert. Der lösliche, homogene Zellextrakt wurde direkt für die Reinigung von Proteinen weiterverwendet.

Tabelle 46: Lysepuffer

Bestandteil	Menge
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM

Der pH wurde mit Na₂HPO₄ auf 8 eingestellt; autoklaviert

3.6.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach ⁴¹¹ durchgeführt. Erst nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen (Tabelle 47). Die Proben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer (Tabelle 48) versetzt. Die Gelkammer wurde bis zum erforderlichen Limit mit 1x SDS-Laufpuffer (Tabelle 49) befüllt. Zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde eine konstante Spannung von 80 V eingestellt und für das Trenngel auf 150 V erhöht. Die Elektrophorese erfolgte so lange, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreichte. Zum Anfärben der Proteinbanden wurde das Gel in Färbelösung (Tabelle 50) für mindestens 1 h schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Gele mehrfach in Entfärbelösung (Tabelle 51) inkubiert, bis die Hintergrundfärbung verschwand. Die Gele wurden zur Analyse und Dokumentation eingescannt.

Tabelle 47: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels (12%)

Bestandteil	Menge im Trenngel	Menge im Sammelgel
Tris/HCl 1,5 M (pH 8,8)	1,25 ml	-
Tris/HCl 0,5 M (pH 6,8)	-	0,625 ml
Bis-Acrylamid 30% (v/v)	2 ml	0,325 ml
SDS 10% (w/v)	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl
APS 10% (w/v)	50 µl	25 µl
Wasser	1,7 ml	1,5 ml

Tabelle 48: SDS-Probenpuffer (5x)

Bestandteil	Menge
Tris/HCl (pH 6,8)	250 mM
DTT	500 mM
SDS	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
Glycerin	50 % (w/v)

Tabelle 49: SDS-Laufpuffer (10x)

Bestandteil	Menge
Tris	250 mM
Glycin	192 mM
SDS	1 % (w/v)

Tabelle 50: Coomassie-Färbelösung

Bestandteil	Menge
Methanol	45 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blau G 250	0,25 % (w/v)

Tabelle 51: Entfärbelösung

Bestandteil	Menge
Ethanol	45 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

3.6.3 Ultrafiltration zur Aufkonzentrierung von löslichen Proteinen

Die Proteinlösung wurde in einen Zentrifugenfilter (Ausschlussgrenze 30 kDa) von Merck Millipore (Darmstadt) gegeben und bei 4°C und 5000 x *g* zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht war.

3.6.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von löslichen Proteinen wurde das NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer nach Herstellerangaben verwendet. Als Parameter für die Berechnung der Proteinkonzentration wurden die Größe und der spezifische Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins mit der gemessenen Absorption von der Software des Photometers verrechnet.

3.6.5 Isolierung von rekombinanten Proteinen über Ni-NTA-Agarose

Der lösliche Zellextrakt wurde mit 50 – 100 µl Ni-NTA-Agarose versetzt und für 1 h bei 4°C und 150 rpm gerührt. Die Suspension wurde über eine leere Plastiksäule mit Fritte von der Ni-NTA-Agarose separiert. Das Säulenmaterial mit gebundenem Protein wurde drei Mal mit mindestens 3 ml Waschpuffer (Tabelle 52) gespült. Zur Elution wurden 500 µl Elutionspuffer (Tabelle 53) auf das Material gegeben und für 2 min bei geschlossener Säule inkubiert, bevor das eluierte Protein aufgefangen wurde. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Zum Umpuffern auf Proteinlagerpuffer (Tabelle 54) wurden PD10 Sephadex G-25 Säulen (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) nach Herstellerangaben benutzt. Bei allen Schritten wurden Proben für die Analyse mittels SDS-PAGE entnommen.

Tabelle 52: Waschpuffer

Bestandteil	Menge
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM

Der pH wurde mit Na₂HPO₄ auf 8 eingestellt; autoklaviert

Tabelle 53: Elutionspuffer

Bestandteil	Menge
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

Der pH wurde mit Na₂HPO₄ auf 8 eingestellt; autoklaviert

Tabelle 54: Proteinlagerpuffer

Bestandteil	Menge
Tris	50 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Der pH wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt; autoklaviert

3.6.6 Präparative Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde bei 4°C mit einer HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) an einem ÄKTaprime™ plus FPLC-System (GE Healthcare) durchgeführt. Die Puffer wurden vor Verwendung filtriert (0,2 µm; Merck Millipore) und gekühlt. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumen des jeweiligen Puffers äquilibriert, bevor maximal 1 ml der Probe injiziert wurde. Bei einer Flussrate von 0,5 ml min⁻¹ und einem Maximaldruck von 0,4 MPa wurden Fraktionen à 0,5 ml aufgefangen. Nach dem Lauf wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen ddH₂O gewaschen und auf 20 % (v/v) Ethanol gelagert.

3.6.7 *In Vitro*-Enzymassays

Falls nicht anders angegeben betrug das Volumen der Assays 50 µl. Die Reaktionen wurden in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) durchgeführt. Zusätze wie Salze oder Kofaktoren wurden im gleichen Puffer gelöst, die Substrate dagegen wurden aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit in wässrigen Lösungen in DMSO gelöst. Alle Bestandteile mit Ausnahme der DMSO-gelösten Substrate wurden bis zum Ansatz der Reaktion auf Eis inkubiert. Zum Start der Reaktion wurde das Substrat als letzter Bestandteil zugegeben, die Lösung leicht gemischt und sofort in einen Heizblock mit der erforderlichen Inkubationstemperatur gestellt. Die Termination der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 µl Methanol. Nach Zentrifugation für 10 min bei 17000 x g wurde die Lösung direkt per HPLC oder LC-MS analysiert.

3.7 Fütterungsexperimente

3.7.1 Fütterungsexperimente mit *Saccharomyces cerevisiae*

5 ml SC-Ura wurden mit einer Einzelkolonie eines *S. cerevisiae* Expressionsstammes inokuliert und bei 30°C schüttelnd mit 200 rpm über Nacht inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 3 ml benutzt, um 500 ml SC-Ura + 2 % (w/v) Galaktose anzupflegen. Diese wurden bei 30°C schüttelnd mit 200 rpm für 36 h inkubiert, bevor die Zellen durch Zentrifugation mit 1200 x *g* für 5 min pelletiert wurden. Die Hefe wurde in 100 ml YPD resuspendiert und es wurden 0,04 mM in DMSO-gelöstem Substrat zugegeben. Dieser Ansatz wurde für maximal 2 Wochen unter regelmäßiger Probenentnahme bei 30°C schüttelnd mit 200 rpm inkubiert. Die Proben wurden durch Zugabe von dreimal einem Volumen Ethylacetat extrahiert. Nach dem Eintrocknen der Extrakte wurden diese in 50 µl Acetonitril rückgelöst und über HPLC oder LC-MS analysiert.

3.7.2 Fütterungsexperimente mit *Aspergillus nidulans*

Vom PD Flüssigmedium (Tabelle 21) wurden 5 ml mit den erforderlichen Supplementen in einem 25 ml Erlenmeyerkolben mit 4×10^5 Sporen des jeweiligen Expressionsstammes inokuliert. Das in DMSO-gelöste Substrat wurde mit einer Endkonzentration zwischen 20 – 200 µM zugegeben. Die Standkulturen wurden bei 25°C für 4 – 7 Tage unter Lichtausschluss inkubiert. Neben dem Expressionsstamm wurden auch Fütterungskulturen mit dem Leervektor-Kontrollstamm *A. nidulans* JN002 (Tabelle 14) angesetzt und die Stabilität des Substrats im Medium ohne Pilz überprüft. Nach der Inkubation wurden die Kulturen in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt, mit 30 ml Ethylacetat versetzt und mit einem ULTRA-TURRAX® für 30 sec bei 10000 rpm homogenisiert. Zur besseren Phasentrennung wurde diese Mischung für 5 min bei 5000 x *g* zentrifugiert. Die organische Phase wurde über Zellulosefilter filtriert und getrocknet. Der Extrakt wurde in 200 µl Acetonitril rückgelöst und über HPLC oder LC-MS analysiert.

3.8 Extraktion und Isolierung von Sekundärmetaboliten

3.8.1 Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Reiskulturen

Die in dieser Arbeit erschaffenen *A. nidulans* Expressionsstämme wurden hauptsächlich auf Reismedium inkubiert, da auf diesem die effizienteste Produktion der erwarteten Sekundärmetabolite beobachtet werden konnte. Die gezogenen Proben oder die kompletten Kulturen wurden mit dem dreifachen Volumen Ethylacetat überschichtet, mit einem Löffel leicht angelöst und gerührt, bevor sie für 20 min in einem Ultraschallbad inkubiert wurden. Die Flüssigkeit wurde durch einen mit Glaswolle ausgestopften Trichter gefiltert und in einen Scheidetrichter überführt. Der Extraktionsprozess wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Bei großen Volumina wurde zur besseren Phasentrennung ca. 50 ml gesättigte NaCl-Lösung in den Scheidetrichter gegeben und nach dem Mischen und Ablassen der wässrigen Phase wurde die organische Phase durch einen Zellulosefilter, gefüllt mit 3 Löffeln Na₂SO₄, vom restlichen Wasser befreit. Bei niedrigen Volumina wurde der Extrakt direkt durch einen Zellulosefilter mit Na₂SO₄ gefiltert. Das Lösungsmittel wurde an einem Rotationsverdampfer bis zur

Trockenheit evaporiert und der Extrakt wurde in Methanol oder Acetonitril (1 ml mg^{-1} Extrakt) gelöst. Nach Zentrifugation für 10 min bei $17000 \times g$ wurden die Proben mittels HPLC oder LC-MS analysiert.

3.8.2 Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Flüssigkulturen

Die Flüssigkultur wurde mit 1 Volumen Ethylacetat versetzt und mit einem ULTRA-TURRAX® für 30 sec bei 10000 rpm homogenisiert, damit auch innere Bereiche des Mycels mit dem Lösungsmittel in Kontakt kommen. Zur besseren Phasentrennung wurde das Gemisch bei $5000 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Die organische Phase wurde durch einen Zellulosefilter mit 3 Löffeln Na_2SO_4 filtriert. Der Extraktionsprozess wurde noch weitere zweimal wiederholt. Der wasserfreie Extrakt wurde bis zur Trockenheit an einem Rotationsverdampfer eingengt und in Methanol oder Acetonitril (1 ml mg^{-1} Extrakt) gelöst. Nach Zentrifugation für 10 min bei $17000 \times g$ wurden die Proben mittels HPLC oder LC-MS analysiert.

3.8.3 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Extrakten

Der getrocknete Extrakt wurde gewogen, in Aceton gelöst und auf die 1,5 – 2-fache Menge (w/w) 0,2 – 0,5 mm Kieselgel 60 (Roth, Karlsruhe) aufgezogen. Das geladene Kieselgel wurde auf eine Säule mit 0,04 – 0,063 mm Kieselgel 60 (Roth, Karlsruhe) aufgebracht. Mit verschiedenen Lösungsmittelgradienten (Petrol:Ethylacetat; Ethylacetat:Methanol) wurde der Extrakt fraktioniert. Mittels semi-präparativer HPLC wurde die gewünschte Substanz aus den Fraktionen isoliert.

3.9 Analytische Methoden

3.9.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Massenspektrometrie (LC-MS)

Die Analyse von Extrakten und *in vitro*-Assays wurde an Systemen der 1200er Serie von Agilent (Santa Clara, CA, USA) mit einer Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 ($5 \mu\text{m}$, $150 \times 4.6 \text{ mm}$) oder einer Multospher 120 RP18 ($5 \mu\text{m}$, $250 \times 2 \text{ mm}$) (CS, Langerwehe) Säule durchgeführt. Wasser (A) und Acetonitril (B), beide mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure, wurden als Lösungsmittel mit einer Flussrate von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ benutzt. Die Substanzen wurden mit einem linearen Gradienten von 5 – 100 % (v/v) B in 40 min eluiert gefolgt von dem Waschen der Säule mit 100 % (v/v) B für 5 min und Äquilibration mit 5 % (v/v) B für 10 min. Die Isolierung von Substanzen via semi-präparativer HPLC erfolgte an den gleichen Systemen mit Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 ($5 \mu\text{m}$, $250 \times 9,4 \text{ mm}$) oder Multospher 120 RP18 ($5 \mu\text{m}$, $250 \times 10 \text{ mm}$) (CS Langerwehe) Säulen.

LC-MS Analysen wurden an einem Agilent 1260 HPLC System mit einer Multospher 120 RP18- 5μ ($5 \mu\text{m}$, $250 \times 2 \text{ mm}$) (CS, Langerwehe) Säule in Verbindung mit einem microTOF-Q III Spektrometer (Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer) (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) durchgeführt. Wasser (A) und Acetonitril (B), beide mit 0,1 % Ameisensäure, wurden als Lösungsmittel mit einer Flussrate von $0,25 \text{ ml min}^{-1}$ benutzt. Die Gradienten bzw. Methode war identisch zur HPLC-Analyse. Zur

Bestimmung der exakten Massen wurden die positive oder negative Elektrospray-Ionisierung verwendet. Die Kapillarspannung betrug 4,5 kV mit einer Kollisionsenergie von 8,0 eV. Zur internen Massenskalibrierung wurde in jedem Lauf Natriumformiat benutzt. Die Massen wurden in einem Bereich von m/z 100 – 1500 analysiert. Die Daten wurden mit der Compass DataAnalysis 4.2 Software (Bruker Daltonics) evaluiert. Die Messungen wurden von Frau Rixa Kraut oder Frau Lena Ludwig-Radtke durchgeführt.

3.9.2 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden an einem JEOL ECA-500 MHz Spektrometer (JEOL, Tokyo, Japan) von Herrn Stefan Newel oder Frau Dr. Regina Ortmann aufgenommen. Die Substanzen wurden dazu in deuteriertem Lösungsmittel gelöst. Alle Spektren wurden mit MestReNova 6.1.0 (Mestrelab, Santiago de Compostela, Spanien) verarbeitet. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf die Signale der Lösungsmittel.

3.10 Bioinformatische Methoden

3.10.1 Bioinformatische Analyse von Genomen zur Identifikation potenzieller BGCs

Verschiedene Ausgaben des Online-Tools AntiSMASH (<https://fungismash.secondarymetabolites.org>) wurden für die automatische Durchsuchung von Pilzgenomen nach potenziellen biosynthetischen Genclustern genutzt.^{149,412,413} Zur Überprüfung auf die korrekte Annotation der in der NCBI Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hinterlegten Sequenzen erfolgte mittels verschiedener Genannotations-Tools wie z.B. FGENESH⁴¹⁴ oder dem speziell für Biosynthesegene des Sekundärmetabolismus entwickelten 2ndFind (<http://biosyn.nih.go.jp/2ndFind/>). Die Vorhersage-Parameter basierten dabei auf nahen verwandten Organismen zum Ursprungsorganismus der Query-Sequenz.

3.10.2 Alignment von Sequenzen

Der Vergleich zwischen Sequenzen einzelner Proteine wurde entweder über ein globales Alignment nach Needleman-Wunsch mittels EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) oder über das Basic Local Alignment Search Tool (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) des NCBI durchgeführt. Zum Vergleich mehrerer Proteinsequenzen wurden *Multiple Sequence Alignments* über Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) durchgeführt.

3.10.3 Curve-Fitting mit GraphPad Prism

Die Verarbeitung der Daten zu den Enzymkinetiken von FogH oder der substratkonzentration-abhängigen Produktbildung durch EchPT2 erfolgte mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Der Curve-Fit anhand der Daten erfolgte bei gegebener Michaelis-Menten-Kinetik über die in der Software integrierte non-lineare Regression anhand der Formel:

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]}$$

Für die Substratinhibition mit der EchPT2 ließ sich der beste Curve-Fit allerdings nicht durch die im Programm hinterlegte Formel erzielen, stattdessen wurde die beste Anpassung über die Hill-Kinetik mit einem integrierten Term zur Berücksichtigung der Substratinhibition erreicht. Die Formel dazu wurde von Herrn Prof. Dr. Johann Heider (FB Biologie, Philipps-Universität Marburg) entwickelt:

$$v = \frac{V_{max} [S]^N}{K_M + [S]^N + \frac{[S]^{N+M}}{K_{is}^M}}$$

Dabei ist K_{is} die Dissoziationskonstante für das Binden zweier Substratmoleküle am Enzym und trägt die gleiche Einheit wie die Substratkonzentration $[S]$. N ist der Hill-Koeffizient, wobei M den für die Substrathemmung eingeführten Kooperationskoeffizienten darstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Flavoglaucin-Biosynthese in *Aspergillus ruber* QEN-0407-G2

4.1.1 Produktion von Flavoglaucin und seinen Analoga in Pilzen der *Aspergillus glaucus*-Gruppe

Wie schon in Kapitel 1.4.1 erwähnt, konnten Flavoglaucin und seine Analoga insbesondere aus Ascomyceten der *A. glaucus*-Gruppe isoliert werden. Vor der weiteren Arbeit mit diesen Organismen sollte deren Fähigkeit zur Herstellung dieser Substanzen bestätigt werden. Dazu wurden die Stämme *A. ruber* QEN-0407-G2, *A. glaucus* NRRL 116 und *A. cristatus* CGMCC 3.6083 für 28 Tage in PD Flüssigmedium mit NaCl bei 25°C als Oberflächenkultur und unter Lichtausschluss kultiviert. Der Extrakt dieser Kulturen wurde mittels LC-MS analysiert (Abbildung 31).

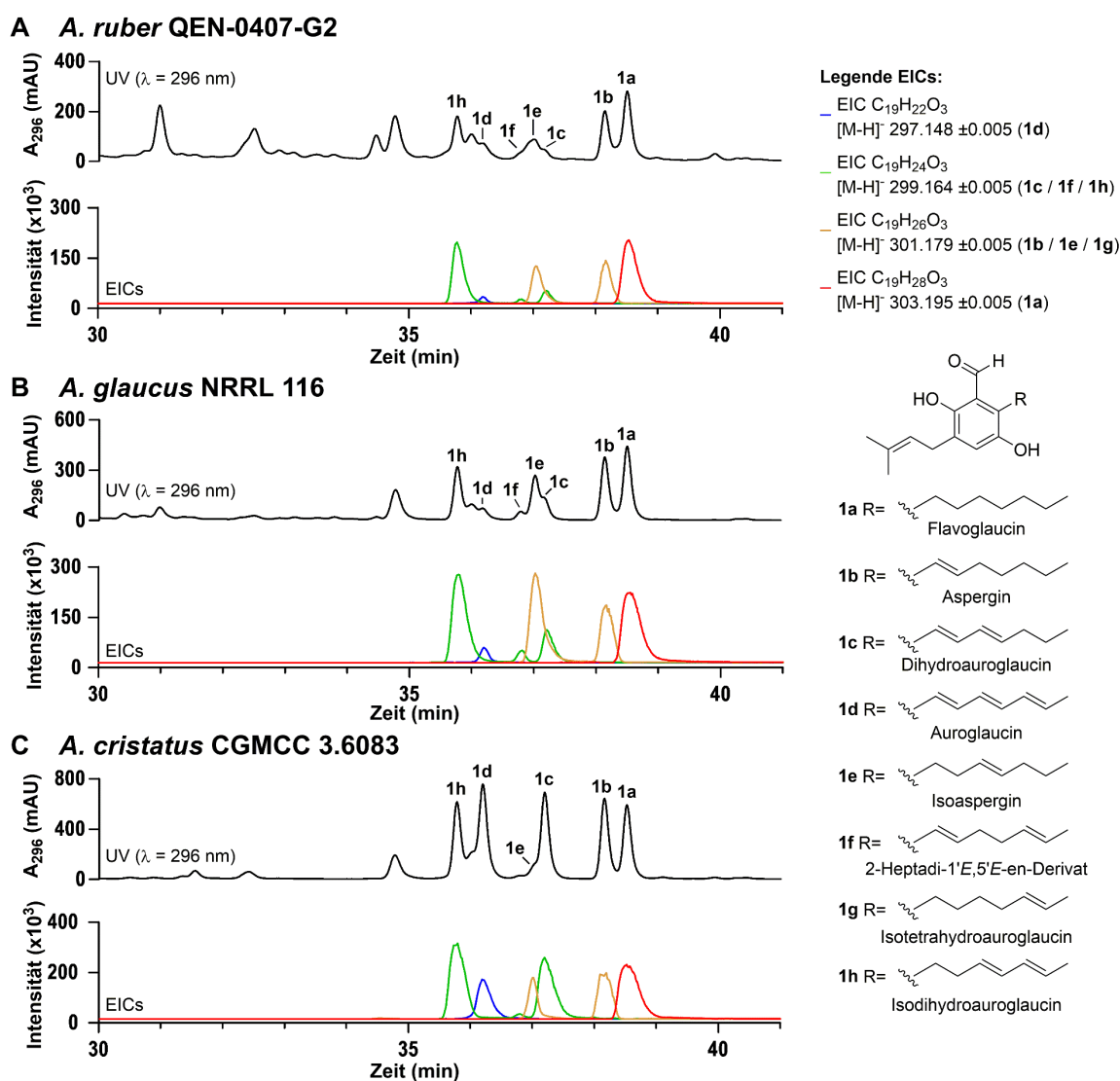


Abbildung 31: LC-MS Analyse von Extrakten aus *A. ruber*, *A. glaucus* und *A. cristatus*

In Extrakten aus *A. ruber* QEN-0407-G2 (A), *A. glaucus* NRRL116 (C) und *A. cristatus* CGMCC 3.6083 (C), gewachsen auf PD Flüssigmedium mit NaCl für 4 Wochen, konnten Flavoglaucin (1a) und seine Analoga (1b – 1f, 1h) detektiert werden.

In allen drei Stämmen konnten die Massen von Flavoglaucin (**1a**) und seinen Analoga **1b** – **1f** und **1h** nachgewiesen werden. In *A. ruber* war **1a** mit seiner komplett gesättigten Seitenkette das Hauptprodukt, während mit Ausnahme von **1h** die Menge der Produkte mit zunehmender Anzahl an Doppelbindungen der Seitenkette abnahm (Abbildung 31A). Das komplett ungesättigte **1d** wurde nur in geringer Menge detektiert. Verglichen mit *A. ruber* konnten die Substanzen in *A. glaucus* mit einem ähnlichen Verhältnis zueinander dokumentiert werden (Abbildung 31B). Die Ausnahme bildete *A. cristatus* der von den drei Pilzen die höchste Menge der Salicylaldehyde produzierte (Abbildung 31C). In seinem Extrakt wurden **1a** – **1d** und **1h** in nahezu vergleichbarer Quantität entdeckt, ohne dass bei den Mengen zwischen der Anzahl an Doppelbindungen in der Heptyl-Seitenkette diskriminiert wurde. Im Gegensatz zu *A. glaucus* wurde hier weniger **1e** und **1f** detektiert.

4.1.2 Entdeckung und bioinformatische Analyse des potenziellen Genclusters für die Flavoglaucinbiosynthese

Mit Hilfe bioinformatischer Methoden wurde das Genom von *Aspergillus ruber* nach vielversprechenden neuen und unidentifizierten BGCs durchsucht (Genome Mining; siehe Kapitel 1.5.3). Das Online-Tool antiSMASH dient zur genomweiten Identifikation, Annotation und Analyse dieser Gencluster im Genom von Bakterien und Pilzen. Im Rahmen der Analyse des kompletten Genoms von *A. ruber* QEN-0407-G2 mit antiSMASH 2.0 (durchgeführt von Herrn Dr. Florian Kindinger, 2016) konnte im Speziellen ein Cluster identifiziert werden, der für potenziell relevante Enzyme der Flavoglaucinbiosynthese kodiert: eine Polyketidsynthase, mehrere Oxidoreduktasen, ein Cytochrom P450 und eine Prenyltransferase. Dieser Cluster ist auf dem scaffold00012 der *whole genome shotgun sequence* (GenBank-ID: KK088422) der Genomdaten von *A. ruber* CBS135680 zu finden. Die Vorhersage der Grenzen eines Genclusters bedarf nach der automatischen Analyse in den meisten Fällen manueller Kuration, da von antiSMASH alle Gene, die eine mögliche Aufgabe im Sekundärstoffwechsel erfüllen könnten und auf dem Genom nicht unweit eines Backbone-Gens kodiert sind, zu einem Cluster zusammengefasst werden (Abbildung 32).

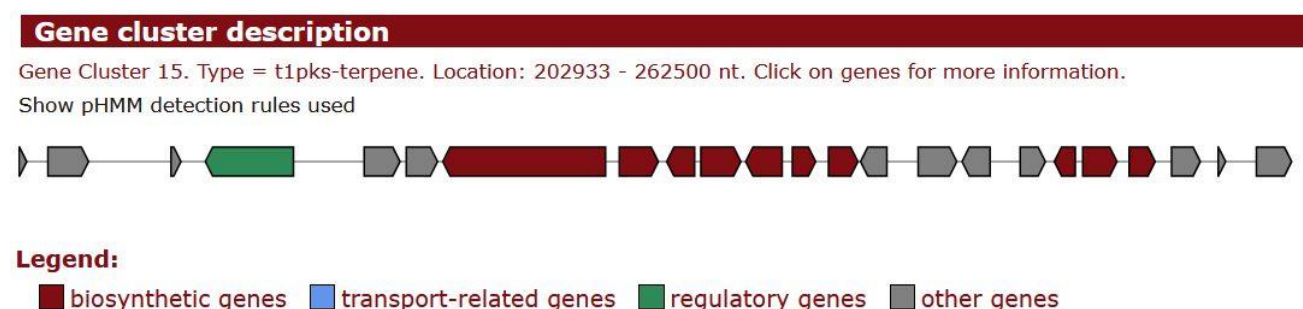


Abbildung 32: Auszug aus dem Output der antiSMASH 2.0 Analyse des entdeckten Genclusters in *A. ruber* CBS 135680
Dieser Teil des Outputs der antiSMASH 2.0 Analyse des *A. ruber* CBS 135680 Genoms macht deutlich, dass neben biosynthetisch relevanten Genen einem Cluster auch irrelevante Gene zugeordnet werden können und so die Grenzen des Clusters nicht akkurat vorherzusagen sind.

Tabelle 55: Putative Funktionen der Proteine kodiert durch den *fog*-Cluster und seine umgebenden Gene in *A. ruber*

Gen	Länge (in bp)	Protein	Länge (in AA)	Putative Funktion
EURHEDRAFT_412144	1353	EYE95331	450	Aminosäure Transporter
EURHEDRAFT_537038	504	EYE95332	167	Membran-assoziiierende Domäne enthaltendes Protein
EURHEDRAFT_455472	4098	EYE95333	1365	MAP-Kinase
EURHEDRAFT_455859	1437	EYE95334	478	Ammonium Transporter MEP2
EURHEDRAFT_412148	1164	EYE95335	387	nuklearer mRNA splicing Faktor-assoziiertes Protein
<i>fogA</i> (EURHEDRAFT_499888)	7836	FogA (EYE95336)	2403	hoch-reduzierende Polyketidsynthase
<i>fogB</i> (5' Teilsequenz von EURHEDRAFT_377419)	921	FogB	273	kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase
<i>fogC</i> (3' Teilsequenz von EURHEDRAFT_377419)	612	FogC	203	Cupin Domäne-enthaltendes Protein
<i>fogD</i> (EURHEDRAFT_455854)	1314	FogD (EYE95338)	286	kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase
<i>fogE</i> (EURHEDRAFT_455792)	1617	FogE (EYE95339)	538	Cytochrom P450
<i>fogF</i> (EURHEDRAFT_412154)	1494	FogF (EYE95340)	497	FAD-abhängige Oxidoreduktase
<i>fogG</i> (EURHEDRAFT_515220)	1101	FogG (EYE95341)	348	kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase
<i>fogH</i> (EURHEDRAFT_530727)	1305	FogH (EYE95342)	434	Prenyltransferase
<i>fogI</i> (EURHEDRAFT_402538)	1248	FogI (EYE95343)	415	Transkriptionsfaktor
EURHEDRAFT_412157	2115	EYE95344	447	Tubulin beta
EURHEDRAFT_499916	1332	EYE95345	420	hypothetisches Protein
EURHEDRAFT_402541	1194	EYE95346	239	hypothetisches Protein
EURHEDRAFT_55617	1446	EYE95347	294	Metallo-Hydrolase
EURHEDRAFT_530731	1806	EYE95348	496	Succinat-Semialdehyd Dehydrogenase
EURHEDRAFT_402544	1224	EYE95349	355	GroES-like Protein
EURHEDRAFT_377432	1353	EYE95350	450	hypothetisches Protein
EURHEDRAFT_412165	882	EYE95351	117	hypothetisches Protein
EURHEDRAFT_377433	1665	EYE95352	505	Purin-Cytosin Transporter

Die Gene des *fog*-Clusters sind mit *fogA* – *fogI* benannt und von den umliegenden Genen durch die Trennlinien in der Tabelle zu unterscheiden.

Des Weiteren wurden die Gene nach der Sequenzierung des *A. ruber* Genoms automatisch annotiert, was dazu führen kann, dass der Start oder das Ende eines Gens ebenfalls ungenau bestimmt sind. Daher ist es unabdingbar, dass die Gene manuell untersucht und mittels verschiedener Genannotations-Tools wie z.B. FGENESH oder das speziell für Biosynthesegene des Sekundärmetabolismus entwickelte 2ndFind (<http://biosyn.nih.gov/2ndFind/>) auf ihre korrekte Annotation überprüft werden.

Nach eingehender manueller Überprüfung mit den genannten Tools enthält der Cluster neun Gene. Diese wurden mit den Kürzeln *fogA* – *fogl* gekennzeichnet. *fogA* (EURHEDRAFT_499888) kodiert für eine HR-PKS (EYE95336); *fogB*, *fogD* und *fogG* (EURHEDRAFT_377419 Teilsequenzen, _515220) kodieren für kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (SDRs; inkorrekt annotiertes EYE95337, EYE95338, EYE95341); *fogC* (EURHEDRAFT_377419 Teilsequenz) für ein Cupin-Domäne enthaltendes Protein (inkorrekt annotiertes EYE95337); *fogE* (EURHEDRAFT_455792) für ein Cytochrom P450 (EYE95339); *fogF* (EURHEDRAFT_412154) für eine FAD-abhängige Oxidoreduktase (EYE95340); *fogH* (EURHEDRAFT_530727) für eine DMATS-PT (EYE95342) und *fogl* (EURHEDRAFT_402538) für einen Transkriptionsfaktor (EYE95343) (Tabelle 55). Durch Analyse mit FGENESH und 2ndFind stellte sich heraus, dass das Gen EURHEDRAFT_377419 in der NCBI Datenbank inkorrekt annotiert wurde. EURHEDRAFT_377419 enthält kodierende Sequenzen für zwei verschiedene Gene. Der 5'-Teil kodiert für die kurzkettige Dehydrogenase/Reduktase FogB und der 3'-Teil für das Cupin-Protein FogC. Die um den *fog*-Cluster liegenden Gene übernehmen voraussichtlich keine Funktion mit Relevanz für den Sekundärmetabolismus.

Eine BLAST-Suche ergab, dass in den eng verwandten Organismen *A. glaucus* und *A. cristatus*, die wie *A. ruber* zur *Aspergillus glaucus*-Gruppe gehören, Homologe zum *fog*-Cluster zu finden sind (Abbildung 33A). Die Sequenzidentitäten von *A. ruber* und *A. cristatus* liegen auf Proteinebene zwischen 86,8 und 93,1 %. Zwischen *A. ruber* und *A. glaucus* sind die Identitäten sogar noch höher und liegen bei 88,6 bis 95,6 %. Die Architektur des Clusters ist in den drei Organismen nahezu identisch. Basierend auf einer Analyse mit der NCBI *Conserved Domain Database* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) scheint das Protein, kodiert durch das zusätzliche Gen ASPGLDRAFT_74985, in *A. glaucus* eine DDE_1 Domäne zu enthalten. DDE Endonukleasen sind Transposasen, die mobile genetische Elemente im Genom umherschoben können. Diese Domäne weist eine geringe Ähnlichkeit (*unspecific hit*) zur rve-Überfamilie der Integrase-Kerndomänen auf. Integrasen vermitteln typischerweise die Integration einer DNA-Kopie eines retroviralen Genoms in ein Wirtschromosom, was darauf hindeutet, dass ASPGLDRAFT_74985 ein Überbleibsel einer viralen Integration in das *A. glaucus* Genom sein könnte. In beiden Fällen übernimmt das Protein keine biosynthetische Funktion und ist damit höchstwahrscheinlich kein signifikanter Teil des Clusters.

Andere Mitglieder der *A. glaucus*-Gruppe wie z.B. *A. chevalieri*, *A. amstelodami*, *A. repens* oder *A. fumigatoides* produzieren ebenfalls Substanzen der Flavoglaucin-Familie,⁸³ doch aufgrund mangelnder Genomdaten wurde der verantwortliche Cluster in diesen Pilzen zuvor noch nicht identifiziert. Es kann jedoch angenommen werden, dass in diesen Organismen ein Cluster mit hoher Homologie zum *fog*-Cluster in *A. ruber* zu finden ist. Nach Publikation der Ergebnisse zur Biosynthese von Flavoglaucin wurden erst kürzlich umfassende Genomdaten von *A. chevalieri* M1 zur Verfügung gestellt

(30.01.2021; GenBank Assembly Accession: GCA_016861735.1). Wie erwartet konnte auf dessen Chromosom 3 ein Homolog zum *fog*-Cluster identifiziert werden. Die Identitäten zwischen den Aminosäuresequenzen der kodierten Proteine liegen zwischen 85,7 – 92,6 %. (Abbildung 33B).

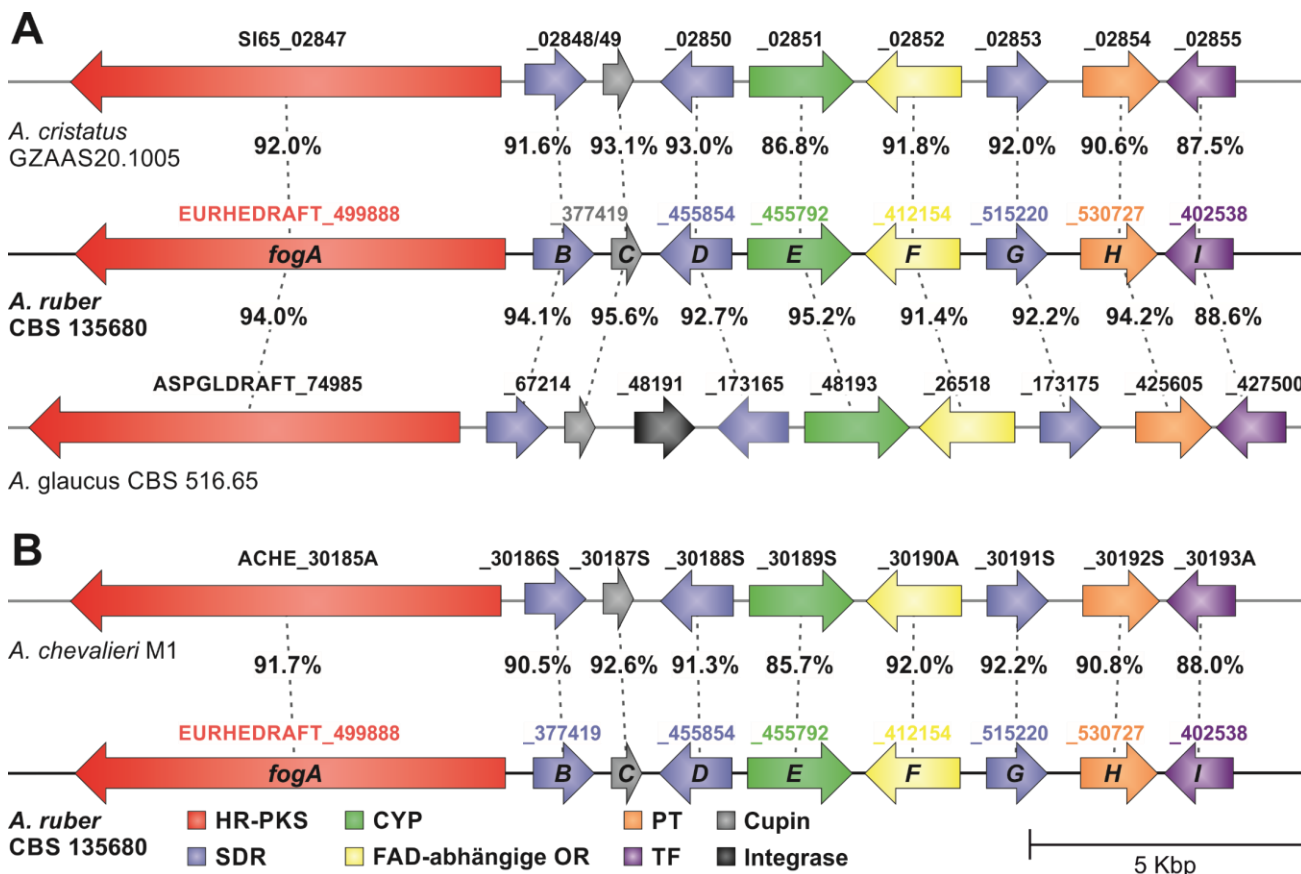


Abbildung 33: Vergleich des *fog*-Clusters aus *A. ruber* mit seinen Homologen in *A. cristatus*, *A. glaucus* und *A. chevalieri*
 Vergleich des *fog*-Clusters aus *A. ruber* mit den Homologen aus *A. cristatus* und *A. glaucus* (A). Vergleich des *fog*-Clusters aus *A. ruber* mit seinem Homolog aus *A. chevalieri* (B). Die Accession-number ist über den jeweiligen Genen notiert. Die Wiedergabe der Identität in Prozent bezieht sich auf die Aminosäuresequenzen der kodierten Proteine. Der Vergleich zwischen den Proteinen der verschiedenen Organismen wurde über ein globales Alignment nach Needleman-Wunsch mittels EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) durchgeführt.

4.1.3 Deletion einzelner *fog*-Gene in *Aspergillus ruber* QEN-0407-G2 mit der Split-Marker Methode

Aus Gründen, die in Kapitel 5.1.1 näher erläutert werden, wurde entschieden, die Funktion der *fog*-Gene im Kontext der Flavoglaucinbiosynthese durch deren Deletion in *A. ruber* QEN-0407-G2 nachzuweisen. Traditionell wird dabei ein Markergen (z.B. ein Antibiotikaresistenzgen) auf einem Plasmid zwischen die flankierenden Bereiche des zu deletierenden Gens kloniert. Der Vektor wird nach dem Linearisieren mittels PCR oder Restriktionsenzym in die Zelle eingebracht und durch Rekombination zwischen den homologen Bereichen im Genom und dem Plasmid wird das Kandidatengen gegen das Markergen ausgetauscht, sodass in haploiden Zellen keine Kopie des Kandidatengens mehr vorhanden ist.⁴¹⁵ Die gezielte Deletion von Genen kann auch abhängig von der Länge der homologen DNA-Fragmente oder vom Integrationslokus ineffizient verlaufen.^{416,417} Wichtiger für die effiziente genetische Modifikation mit dieser Methode jedoch ist die Rate zwischen der homologen Rekombination und der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ, *non-homologous end joining*) als miteinander konkurrierende DNA-Reparaturmechanismen in Zellen verschiedener Organismen. Transformanten, die aufgenommene DNA durch NHEJ im Genom integrieren, erscheinen beim Selektieren nach der Anwesenheit des Markergens als falsch-positiv und erhöhen die Anzahl an Transformanten, die näher genetisch untersucht werden müssen. Während in *S. cerevisiae* durch diese Methode aufgrund der hohen homologen Rekombinationsfrequenz gezielte genetische Modifikationen mit hoher Effizienz möglich sind, ist in anderen Organismen die nicht-homologe Integration von transformierender DNA durch NHEJ viel häufiger der Fall.^{418,419} In Säugerzellen beispielsweise ist nur einer von tausend Transformanten das Resultat einer homologen Rekombination.⁴²⁰

Ähnlich dazu variiert die Rate der homologen Rekombination in Ascomyceten stark. Die Frequenz der gezielten genetischen Modifikation kann durch Einsatz der Split-Marker Methode deutlich optimiert werden. Dabei werden zwei unvollständige aber überlappende Teile eines Markergens mit den Flanken des zu deletierenden Gens fusioniert.⁴²¹ Dadurch ist die ungerichtete Integration eines vollständigen Markergens in das Genom nahezu unmöglich, nur durch homologe Rekombination zwischen den überlappenden Bereichen des Markergens und der homologen Bereiche im Genom mit den Flanken wird das Markergen intakt am Ziellokus integriert (Abbildung 34). Es wurde gezeigt, dass durch Einsatz der Split-Marker Methode die Frequenz der gezielten genetischen Modifikation und homologen Rekombination z.B. in *Alternaria alternata* oder *Cercospora nicotianae* bis auf mindestens 50 % gesteigert werden konnte.^{422,423}

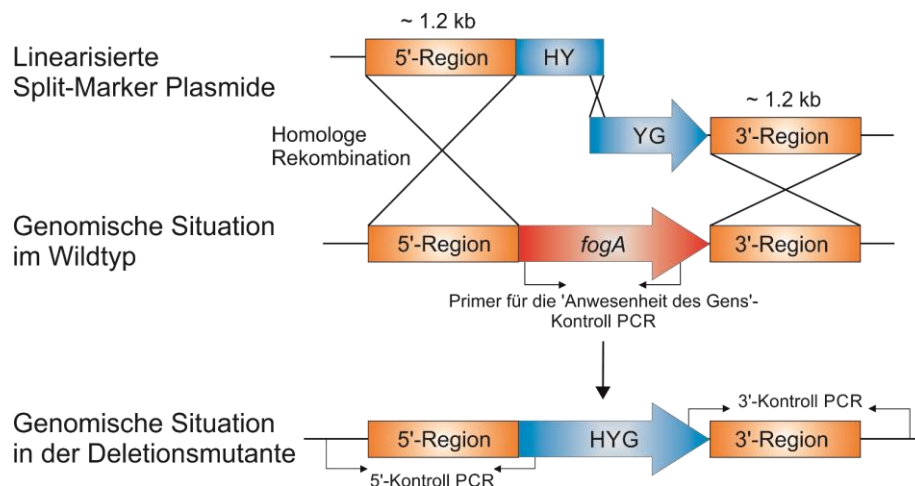


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Gendeletion via Split-Marker am Beispiel von *fogA*

4.1.3.1 Test der Sensitivität von *Aspergillus ruber* QEN-0407-G2 gegenüber Hygromycin B

Nach der Transformation von Zellen mit Fremd-DNA muss gewährleistet werden, dass der Organismus diese nicht direkt abbaut, sondern durch Integration ins Genom oder Aufrechterhaltung als Plasmid einen Selektionsvorteil gegenüber nicht-transformierten Zellen erhält. Dazu enthält das für die Transformation vorgesehene DNA-Konstrukt neben den gewünschten DNA-Sequenzen für gewöhnlich ein Markergen, welches zumeist eine Resistenz gegen ein selektierendes Agens (z.B. Antibiotikum, Antimykotikum etc.) vermittelt. Damit dem Medium die angemessene Menge des Antibiotikums Hygromycin B zur Selektion zugegeben werden konnte, musste die Toleranz von *A. ruber* QEN-0407-G2 gegen dieses bestimmt werden. Dazu wurden Platten PDA + 1,7 % (w/v) NaCl mit unterschiedlichen Konzentrationen dieses Aminoglycosids versetzt und das Wachstum des Pilzes auf diesen Nährmedien beobachtet. Nach 5 Tagen Inkubation konnte beobachtet werden, dass sich auf Platten mit $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ und $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Hygromycin B Kolonien bildeten, während auf Platten mit $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ Hygromycin B oder höher kein Wachstum des Pilzes zu sehen war (Abbildung 35). Als optimale Konzentration zur Selektion auf transformierte Zellen wurde deswegen $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ gewählt.

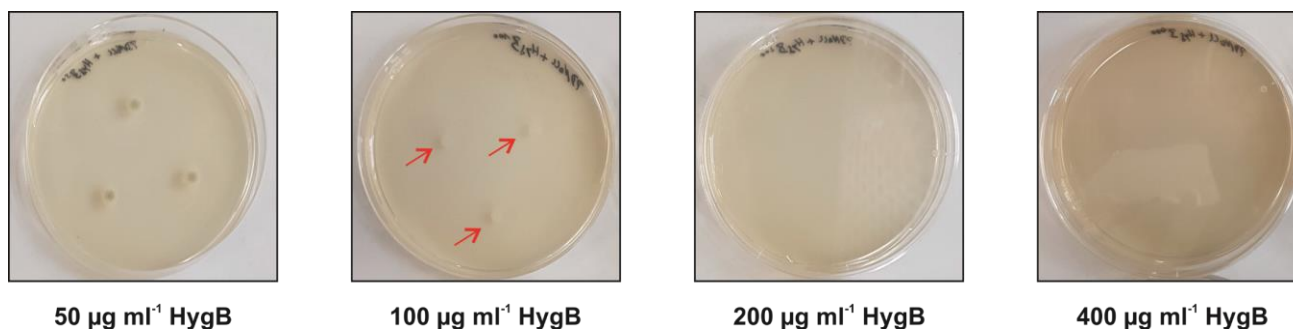


Abbildung 35: Wachstum von *A. ruber* auf PDA + 1,7 % NaCl mit verschiedenen Hygromycin B Konzentrationen

4.1.3.2 Optimierung der Protoplastierungsbedingungen

Ascomyceten unterscheiden sich untereinander nicht nur in der Frequenz der homologen Rekombination, sondern auch in ihrem Verhalten bei der Transformation. Aufgrund der großen Anzahl verschiedener pilzlicher Spezies und des komplexen Aufbaus ihrer Zellwandstrukturen müssen auch häufig gebrauchte Methoden wie die PEG-vermittelte Transformation von Protoplasten spezifisch für jede Spezies optimiert werden. Die Anwendung des Protokolls wie es schon zuvor in der Arbeitsgruppe Li für *A. nidulans* verwendet wurde,⁴²⁴ führte im Falle von *A. ruber* QEN-0407-G2 nicht zum Erfolg. Die Sporulierung des Pilzes fiel auf den gängigen Medien PDA und GMM zu gering aus, um eine ausreichende Menge Konidiosporen für die Protoplastierung zu gewinnen. Zur Optimierung der Sporulierungsbedingungen wurde *A. ruber* QEN-0407-G2 auf den folgenden Festmedien bei 25°C inkubiert: YM, ME20S, G22 und Czapek-Dox (Kapitel 3.3.2). Nach 19 Tagen wurden von jeweils zwei Platten 800 µl Sporensuspension hergestellt. Durch Ausplattieren der 10^{-4} – 10^{-6} Verdünnungen auf GMM wurde der Titer an koloniebildenden Einheiten (KBE) bzw. lebensfähigen Sporen bestimmt (Tabelle 56).

Tabelle 56: KBE-Titer der *A. ruber* Sporensuspensionen gewonnen von verschiedenen Medien

Medium	KBE (ml ⁻¹)
Cz-Dox	$3,2 \times 10^4$
G22	$5,8 \times 10^5$
GMM	$1,2 \times 10^4$
ME20S	$2,8 \times 10^5$
PDA	$6,3 \times 10^4$
YM	1×10^4

Basierend auf dem KBE-Titer schien G22 die besten Sporulierungsbedingungen zu bieten. Wie die Anwesenheit von vielen orange-roten Kleistothecien auf den Platten schon vermuten ließ, bestätigte die mikroskopische Untersuchung der Sporensuspensionen jedoch, dass hauptsächlich Ascosporen durch die sexuelle Vermehrung gebildet wurden. Zur genetischen Modifikation werden vorzugsweise Konidiosporen benutzt, da sie exakte genetische Klone ihrer Vorläuferzellen sind und die genotypische Integrität des Stamms nicht durch meiotische Teilungen beeinträchtigt wird. Für *A. nidulans* wurde gezeigt, dass erhöhte Salzkonzentrationen oder Lichteinstrahlung die Konidiosporenbildung fördert und die Bildung von Kleistothecien mit Ascosporen vermindert.⁴²⁵ Auf Basis dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass verschiedene *A. ruber* Stämme aus salzreichen Gebieten isoliert wurden, wurde *A. ruber* QEN-0407-G2 testweise in kleinen Petrischalen mit PDA + 1,7 % bzw. 3,4 % (w/v) NaCl bei 25°C inkubiert. Nach drei Tagen Inkubation war bereits zu bemerken, dass der Pilz auf salzhaltigem Medium anfang, grau-grüne Konidiosporen zu bilden (Abbildung 36). Nach 5 Tagen wurden von jeweils zwei Platten Sporensuspensionen gewonnen und der Titer durch Auszählung mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dadurch ist eine Vergleichbarkeit zu den vorangegangenen Tests zwar nicht gegeben, aber die Tatsache, dass durch Zugabe von NaCl ins Medium eine ausreichende Menge

Konidiosporen für die weitere Transformation gewonnen werden konnte, machte weitere Optimierungen der Sporulierungsbedingungen obsolet.

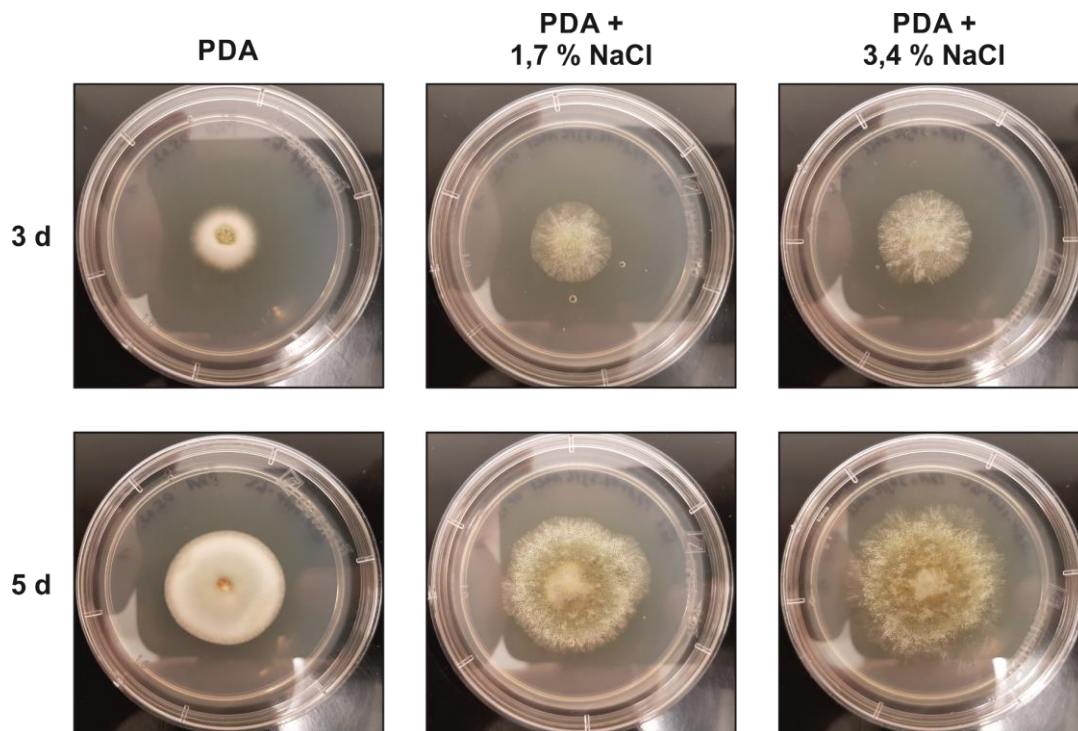


Abbildung 36: *A. ruber* QEN-0407-G2 auf PDA mit verschiedenen Salzkonzentrationen

Auf PDA ohne zusätzliches NaCl ist klar zu erkennen, dass kaum grau-grüne Konidiosporen gebildet werden. Enthält das Medium 1,7 % (w/v) oder mehr NaCl werden Konidiophoren mit den Konidiosporen gebildet.

Tabelle 57: Sporentiter der *A. ruber* Sporensuspensionen, gewonnen von PDA mit verschiedenen Salzkonzentrationen

Medium	Sporen (ml ⁻¹)
PDA	$6,3 \times 10^4$
PDA + 1,7 % NaCl	$1,2 \times 10^7$
PDA + 3,4 % NaCl	$1,1 \times 10^7$

Ein weiterer Faktor für die erfolgreiche Gewinnung von Protoplasten ist die optimale Keimdauer der Sporen. Sporen als Überdauerungsform besitzen eine wesentlich dickere und widerstandsfähigere Wand als vitales Mycel, was dazu führt, dass der adäquate Verdau der Zellwand zur Freisetzung des Protoplasten mit Sporen an sich schwer realisierbar ist. Stattdessen werden die Sporen so lange unter idealen Umweltbedingungen inkubiert (d.h. mit ausreichend Nährstoffen bei optimaler Temperatur), bis sie anfangen einen Keimschlauch zu bilden. Dieser Keimschlauch sollte eine Länge von drei Sporendurchmessern nicht überschreiten, damit noch keine Zellteilung stattfindet und somit noch immer ein haploider Chromosomensatz in der Zelle vorliegt. Zur Bestimmung der Keimungsdauer wurden ca. 3×10^7 Konidiosporen in 30 ml PDB + 1,7 % (w/v) NaCl bei 25°C mit 230 rpm schüttelnd inkubiert. Ab 5 h Inkubationsdauer wurde in stündlichem Abstand eine Probe der Kultur mikroskopisch auf den Status der Keimung untersucht. Nach 11,5 h erreichte der Keimschlauch die erforderliche Länge und es konnte mit dem Verdau der Zellwand begonnen werden.

Zum Abbau der komplexen Zellwand wurden neben lysierenden Enzymen aus *Trichoderma harzianum* (Glucanex®; Merck, Darmstadt) auch der Yatalase™ Enzymmix, gewonnen aus *Corynebacterium* sp. OZ-21 (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan), benutzt. Diese Enzymmische enthalten β -1,3-Glucanasen, Cellulasen, Proteasen, Chitobiasen und Chitinasen. Der Verdau der Zellwand allein mit Glucanex® wie in den zuvor erwähnten Protokollen unserer Arbeitsgruppe war nicht möglich. Die Menge der zugesetzten Enzymmische und die Dauer des Zellwandverdaus sind wichtige Parameter bei der Gewinnung von vitalen Protoplasten und müssen daher ebenfalls für jede Spezies experimentell bestimmt werden. Dazu wurden die Konidiosporen jeweils dreier großer Platten zu Keimlingen herangezogen, in 10 ml osmotischem Medium mit unterschiedlichen Mengen der Enzymmische versetzt und bei 25°C, 30°C oder 37°C mit 100 rpm schüttelnd inkubiert. Trotz der idealen Wachstumstemperatur von 25°C für *A. ruber* QEN-0407-G2 wurden auch höhere Temperaturen zum Zellwandverdau getestet, weil das Temperaturoptimum beider Enzymmische nach Herstellerangaben 37°C betrug. In regelmäßigen Abständen wurde der Status des Zellwandverdaus in Proben der Kulturen mikroskopisch kontrolliert. Nach 4 h konnte in den Ansätzen auf 25°C und 30°C kein weiterer Verdau der Zellwand mehr festgestellt werden, während der Ansatz auf 37°C kaum vollständige Protoplasten aufwies (Abbildung 37). Zur Bestimmung des Titors lebensfähiger Protoplasten (koloniebildende Einheiten) wurden die 10^{-4} bis 10^{-6} Verdünnungen auf GMM ausplattiert und bei 25°C für drei Tage inkubiert, bis kleine Kolonien gezählt werden konnten.

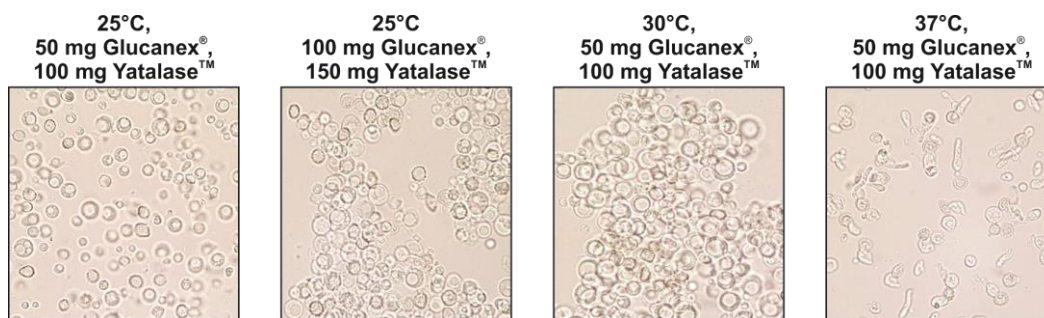


Abbildung 37: Status der Protoplastierung von *A. ruber* QEN-0407-G2 nach 4 h bei verschiedenen Bedingungen

Die gesündesten Protoplasten (dunkle runde Objekte mit einem hellen inneren Kreis) sind bei 25°C mit niedriger Enzymkonzentration zu erkennen. In den anderen Ansätzen sind neben einigen Konidiosporen und Zelltrümmern auch Protoplasten zu erkennen mit Ausnahme des Ansatzes auf 37°C.

Der Ansatz, der bei 25°C mit 50 mg Glucanex® und 100 mg Yatalase™ inkubiert wurde, wies den höchsten Titer an lebensfähigen Protoplasten auf und versprach damit am meisten Erfolg auf eine ausreichende Anzahl Transformanden nach dem Einbringen von DNA *via* PEG-vermittelter Transformation (Tabelle 58).

Tabelle 58: KBE-Titer der *A. ruber* Protoplastierungsansätze

Bedingungen	KBE (ml ⁻¹)
25°C; 50 mg Glucanex®, 100 mg Yatalase™	~ 8.62 – 8.642 x10 ⁸
25°C; 100 mg Glucanex®, 150 mg Yatalase™	~ 7.679 x10 ⁸
30°C; 50 mg Glucanex®, 100 mg Yatalase™	~ 6.5 – 6.596 x10 ⁸
37°C; 50 mg Glucanex®, 100 mg Yatalase™	n.d. (keine Protoplasten)

Zusammenfassend wurde die Protoplastierung von *A. ruber* QEN-0407-G2 mit den in Abbildung 38 dargestellten Bedingungen hinreichend optimiert, um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Transformation zu erhöhen.

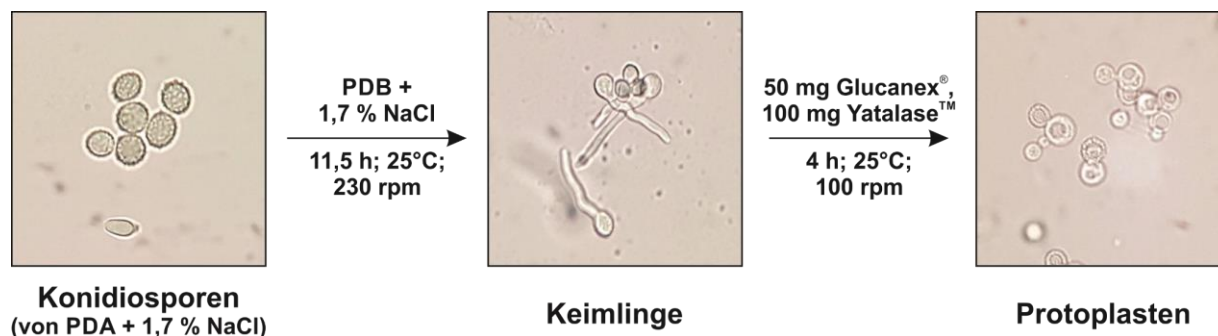


Abbildung 38: Optimierte Bedingungen der Protoplastierung von *A. ruber* QEN-0407-G2

4.1.3.3 Klonierung der Split-Marker Deletionskonstrukte

Nach Überprüfung der Sensitivität gegen Hygromycin B und Optimierung der Protoplastierung konnte mit der Deletion einzelner Gene im *fog*-Cluster begonnen werden. Zunächst sollten die Gene *fogA* und *fogH* deletiert werden. Durch Fehlen der HR-PKS FogA sollte es *A. ruber* nicht mehr möglich sein, Flavoglucin und all seine Analoga zu bilden. Dieser Unterschied im Sekundärmetabolitprofil sollte im Vergleich zum Wildtyp am deutlichsten sichtbar sein. Die Funktion der Prenyltransferase FogH im Kontext der Flavoglucinbiosynthese konnte mit hoher Sicherheit als Prenylierung des Aromaten an C5 postuliert werden, sodass die konkrete Akkumulation von nicht-prenylierten Intermediaten in der *fogH*-Deletionsmutante erwartet wurde. Basierend auf den Split-Marker Basisvektoren p5HY und p3YG wurden die Deletionskonstrukte für beide Gene kloniert.

Von *A. ruber* QEN-0407-G2 gDNA wurde mit den Primern prJN041 und prJN042 ein 1557 bp langes Fragment (1500 bp 5' von *fogH* mit 28 bzw. 29 bp Überhang zu p5HY linearisiert mit BglII und NotI) amplifiziert. Nach Transformation von *E. coli* DH5α mit dem gereinigten Fragment und dem linearisierten p5HY entstand durch HR das Plasmid pJN006 (Abbildung 39A). Das isolierte Plasmid wurde durch einen Restriktionsverdau mit BamHI und XbaI auf seine Korrektheit überprüft. Ein 1588 bp langes Fragment (1528 bp 3' von *fogH* mit jeweils 30 bp Überhang zu p3YG linearisiert mit Sall und SmaI) wurde mit den Primern prJN043 und prJN044 von *A. ruber* gDNA amplifiziert. Der linearisierte Vektor p3YG und das gereinigte Fragment wurden durch HR in *E. coli* DH5α dazu genutzt den Vektor pJN007 zu klonieren, der nach Isolierung durch einen Restriktionsverdau mit HindIII und XbaI auf seine Richtigkeit untersucht wurde (Abbildung 39B). Die Split-Marker Vektoren pJN006 und pJN007 dienten zur Deletion von *fogH* in *A. ruber* QEN-0407-G2.

Mit den Primern prJN053 und prJN054 wurde ein 1654 bp langes Fragment von *A. ruber* QEN-0407-G2 gDNA amplifiziert. Dieses Fragment enthielt neben der 1599 bp langen Sequenz 5' von *fogA* auch 24 bzw. 31 bp lange homologe Sequenzen zu p5HY linearisiert mit den Restriktionsenzymen BglII und NotI. Durch homologe Rekombination des gereinigten Fragments mit dem linearisierten Vektor in

E. coli DH5 α wurde das Plasmid pJN008 kloniert und nach der Isolierung durch einen Restriktionsverdau mit HindIII kontrolliert (Abbildung 39C). Die Primer prJN047 und prJN048 wurden zur Amplifikation eines 1558 bp langen Fragments benutzt (1500 bp 3' von *fogA* mit 28 bzw. 30 bp homologem Überhang zu p3YG linearisiert mit Sall und Sfal). Homologe Rekombination zwischen dem Fragment und linearisiertem p3YG in *E. coli* DH5 α führte zur Klonierung des Vektors pJN009 (Abbildung 39D). Nach der Isolierung wurde pJN009 durch einen Restriktionsverdau mit HindIII und XbaI kontrolliert. pJN008 und pJN009 dienen zur Deletion von *fogA* nach der Split-Marker Methode.

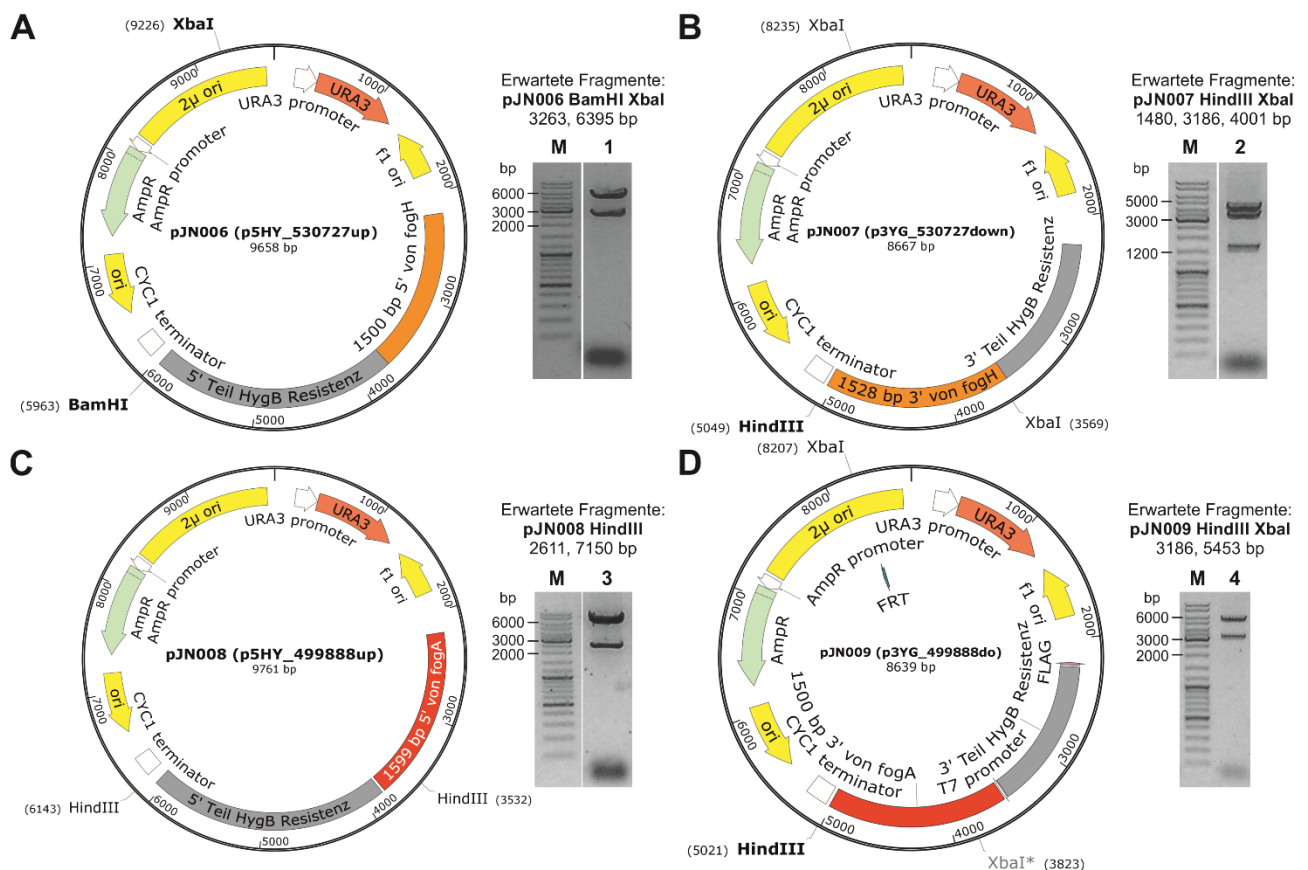


Abbildung 39: Plasmidkarten von pJN006 – pJN009 und Überprüfung der Vektoren via Restriktionsverdau

Plasmidkarte und Restriktionskontrolle von pJN006 mit BamHI und XbaI (Erwartete Fragmente: 3263, 6395 bp) (A), pJN007 mit HindIII und XbaI (Erwartete Fragmente: 1480, 3186, 4001 bp) (B), pJN008 mit HindIII (Erwartete Fragmente: 2611, 7150 bp) (C) und pJN009 mit HindIII und XbaI (Erwartete Fragmente: 3186, 5453 bp) (D).

4.1.3.4 Transformation von *Aspergillus ruber* QEN-0407-G2 mit den Deletionskonstrukten pJN006 – pJN009

Es ist schon seit langem bekannt, dass die gezielte Integration an einem bestimmten Locus via HR in eukaryotischen Systemen inklusive Ascomyceten mit linearisierter DNA effizienter funktioniert, als mit zirkulärer DNA.^{417,426,427} Daher war es notwendig, die Split-Marker Plasmide pJN006/007 bzw. pJN008/009 zur erfolgreichen Deletion von *fogH* und *fogA* zu linearisieren. Um eine Religation aufgrund entstehender *sticky ends* nach Verdau mit nur einem der Restriktionsenzyme zu verhindern wurden die Plasmide mit jeweils zwei Enzymen geschnitten. Die Vektoren pJN006 und pJN008, basierend auf p5HY, wurden mit BamHI und XbaI geschnitten, während pJN007 mit HindIII und SpeI

linearisiert wurde. pJN009 hingegen wurde mit HindIII und BglII verdaut, da die 3'-Flanke von *fogA* eine SpeI-Schnittstelle aufweist. Die Transformation von *A. ruber* QEN-0407-G2 mit den linearisierten Plasmidpaaren pJN006/007 und pJN008/009 wurde, wie im Kapitel 3.5.8 beschrieben, mit den optimierten Parametern aus Kapitel 4.1.3.2 durchgeführt. Bis zu einer Woche nach Inkubation der Platten konnten keine Transformanten für die Deletion von *fogH* und maximal zwei Transformanten für die Deletion von *fogA* entdeckt werden. Die Transformation von *A. ruber* mit diesen Plasmiden wurde mehrfach wiederholt. Dabei wurde neben den Mengen an transformierender DNA (bis zu 3 µg) auch die Menge an Hygromycin B bzw. der Zeitpunkt der Zugabe zum Selektionsmedium variiert. Durch Ausplattieren der Transformationsansätze auf mit Sorbitol osmotisch-stabilisiertem PDA und Inkubation für 24 h ohne selektierendes Antibiotikum sollte potenziellen Transformanten eine schonendere Regeneration ermöglicht werden, bevor die Platten mit ca 5 ml des Hygromycin B-haltigen (200 µg ml⁻¹) Top-Mediums überschichtet und weiter inkubiert wurden. Auch durch diese Maßnahmen war es nicht möglich eine größere Menge an Transformanten zu erzeugen. Für die Deletion von *fogH* konnten keine Transformanten gewonnen werden.

Die gDNA der potenziellen *A. ruber* $\Delta fogA$ Klone wurde isoliert und über PCR mit den Primern prJN064 und prJN082 wurde die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von *fogA* im Vergleich zum Wildtyp überprüft. In Kontroll-PCRs aller der über die gesamten Transformationsversuche erhaltenen (nur zwei!) Transformanten wurde ein ca. 1100 bp Fragment amplifiziert (Abbildung 40, Kontroll-PCR nur eines Klon gezeigt; erwartete Fragmentgröße im Wildtyp: 1105 bp), sodass davon auszugehen war, dass die Deletion von *fogA* nicht funktionierte.

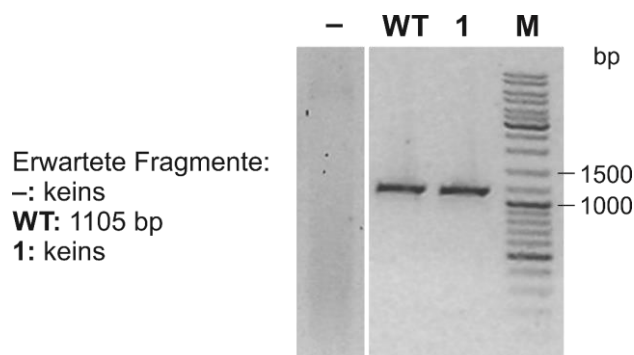


Abbildung 40: Kontroll-PCR zur Bestätigung der *fogA*-Deletion in *A. ruber* QEN-0407-G2

Als Größenstandard (**M**) diente der GeneRuler™ DNA Ladder Mix und für die Negativkontrolle (–) wurde gDNA von *A. nidulans* LO8030 als Templat benutzt. Sowohl die PCR auf gDNA des Wildtyps (**WT**) als auch der potenziellen Deletionsmutante (**1**) wiesen ein Fragment von ca. 1100 bp auf, wie es nur zu erwarten war, wenn *fogA* anwesend ist.

4.1.4 Heterologe Expression des *fog*-Clusters in *Aspergillus nidulans* LO8030

Die Deletion von Genen des *fog*-Clusters im Ursprungsorganismus *A. ruber* stellte sich als ein schwieriger und zeitaufwändiger Prozess heraus, der auch nach vielen Versuchen nicht zum Erfolg führte. Daher wurde die Strategie zur Aufklärung der Flavoglucinbiosynthese geändert. Alternativ zur weiteren Untersuchung des Clusters direkt in *A. ruber* wurde der weitere Schwerpunkt auf dessen heterologe Expression gelegt, um den jeweiligen Sekundärmetaboliten eine Funktion zuzuordnen.

Der Stamm *A. nidulans* LO8030 wurde für die heterologe Expression von Biosynthesegenen des Sekundärstoffwechsels optimiert.⁴⁰⁸ Auxotrophien gegenüber Riboflavin, Pyridoxin, Uracil und Uridin ermöglichen das Benutzen dieser ungefährlichen Marker verglichen mit dem toxischen Hygromycin B. Darüber hinaus wurden acht BGCs, verantwortlich für die Bildung der Hauptsekundärmetabolite Sterigmatocystin, die Emericellamide, Asperfuranon, Monodictyphenon, Terrequinon, F9775A und B, Asperthecin und Austinol/Dehydroaustinol in *A. nidulans* deletiert. Das erleichtert zum einen die Detektion neu gebildeter Produkte, zum anderen stehen so mehr Vorläufermoleküle wie Acetyl-CoA oder Malonyl-CoA für die Biosynthese neuer Produkte zu Verfügung. Wichtige Erkenntnisse zur Biosynthese von Aspercryptin,⁴⁰⁸ Citreoviridin,⁴²⁸ Fumihopaside A,⁴²⁹ *terrestric acid* und eines Isocoumarins aus *P. crustosum*,^{430,431} Oxepinamid F⁴³² und Ustethylin⁴³³ konnten unter anderem durch heterologe Expression in *A. nidulans* LO8030 gewonnen werden. Des Weiteren wurde so der *Pfma*-Gencluster aus *Pestalotiopsis fici* der Biosynthese von Dihydroxynaphtalen (DHN)-Melanin zugeordnet.⁴⁰⁴ Ein weiterer Vorteil bei der Benutzung von *A. nidulans* LO8030 als heterologe Expressionsplattform ist die einfache optische Selektion auf eine Integration am korrekten Lokus. Indem die Flanken 5' und 3' des *wA*-PKS-Gens (produziert Naphtopyron YWA1 als Vorstufe eines grünen Konidienpigments)⁴³⁴ als homologe Bereiche für die HR benutzt werden, führt eine korrekte Integration eingebrachter DNA zur Deletion dieses PKS-Gens und somit zum Verlust des grünen Phänotyps von *A. nidulans* (Abbildung 41).

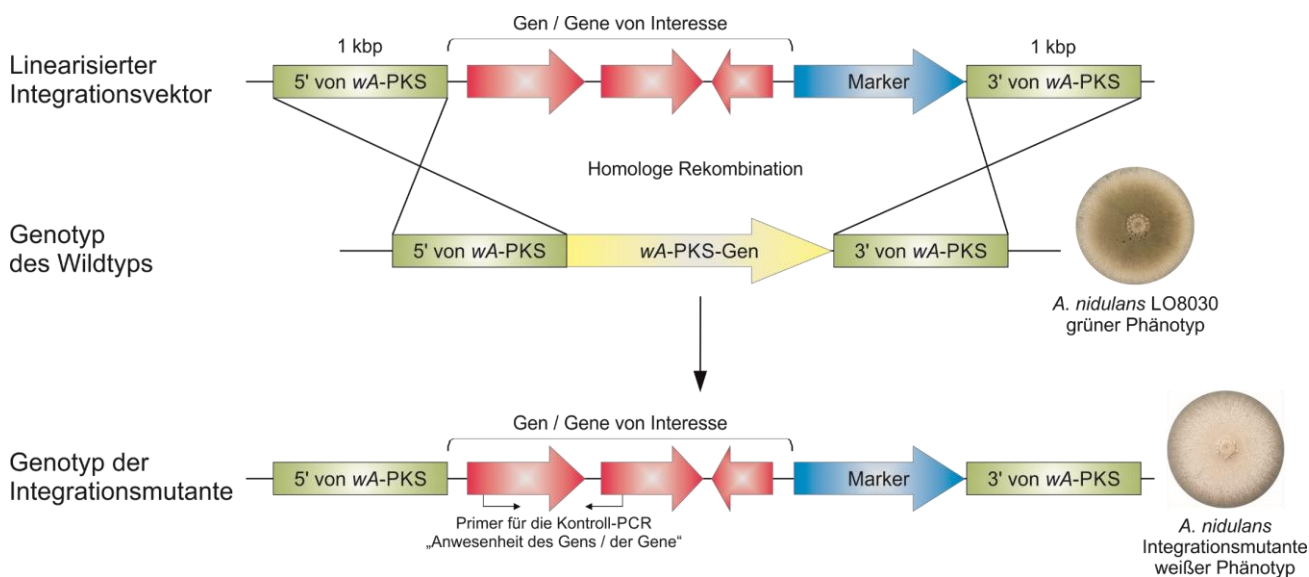


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Integration von Genen ins Genom von *A. nidulans* LO8030

4.1.4.1 Herstellung des Negativkontrollstamms *A. nidulans* JN002

Für die heterologe Expression in *A. nidulans* LO8030 wurde ein *E. coli*/*S. cerevisiae*-Shuttlevektor benötigt, dem es möglich ist, gezielt am Locus des *wa*-PKS-Gens im Genom von *A. nidulans* zu integrieren. Dazu wurde das Plasmid pYWB2 (Abbildung 42A) von Prof. Dr. Wen-Bing Yin's Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.⁴⁰⁴ Vor Benutzung wurde der Vektor durch Verdau mit HindIII und XbaI auf seine Korrektheit überprüft (Abbildung 42B; Erwartete Fragmente: 1125, 1731, 4943 bp). Nach Linearisieren von pYWB2 mit SwaI wurde der gereinigte Vektor zur Transformation von *A. nidulans* LO8030 benutzt. Positive Transformanden wurden per Kontroll-PCR mit den Primern prJN066 und prJN067 (Abbildung 42C; Erwartetes Fragment: 2305 bp) und über ihren weißen Phänotyp (Abbildung 42D) ermittelt. Der hergestellte Stamm *A. nidulans* JN002 diente als Negativkontrolle zum Vergleich mit allen zukünftigen heterologen Expressionsstämmen.

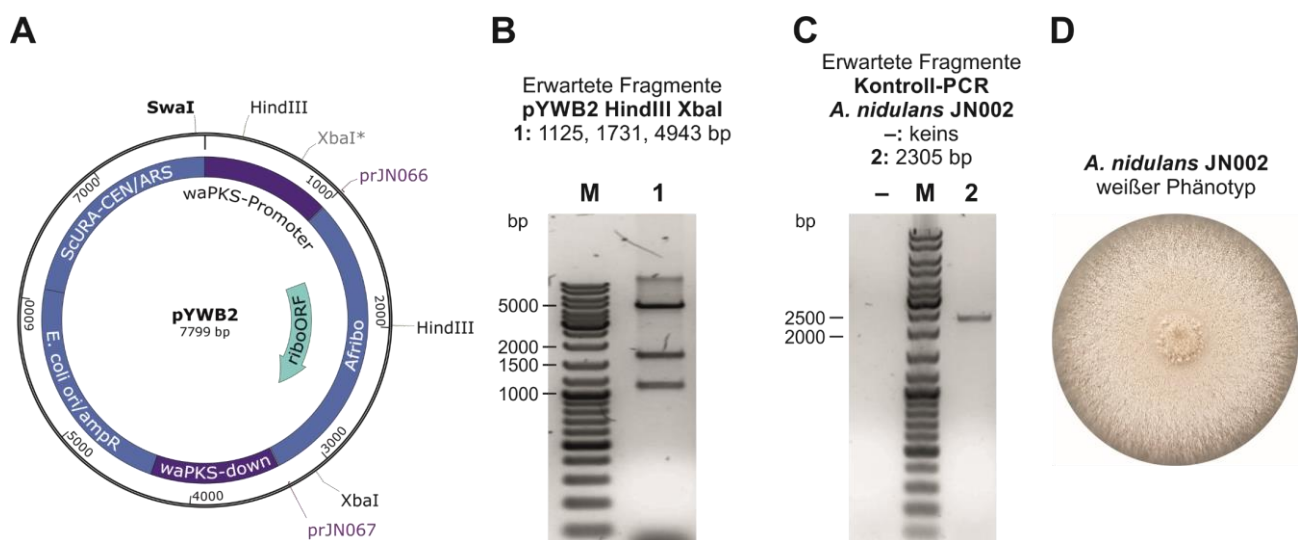


Abbildung 42: Kontrolle von pYWB2 und dem Negativkontrollstamm *A. nidulans* JN002

Plasmidkarte von pYWB2 (A). Restriktionsverdau von pYWB2 mit HindIII und XbaI (Erwartete Fragmente: 1125, 1731, 4943 bp) (B). Kontroll-PCR für *A. nidulans* JN002 (Erwartetes Fragment: 2305 bp) (C). Weißer Phänotyp von *A. nidulans* JN002 (D).

4.1.4.2 Klonierung und heterologe Expression des *fog*-Cluster in *Aspergillus nidulans* LO8030

Der ca. 22 kbp lange *fog*-Cluster (EURHEDRAFT_499888 – _402538 + 500 bp stromaufwärts des ersten und stromabwärts des letzten Gens; bp 222263-244370; unplaced genomic scaffold00012; *A. ruber* CBS135680 Genom, GenBank: KK088422) wurde mit den Primern prJN081 – prJN090 (Tabelle 10) in fünf Fragmenten von *A. ruber* QEN-0407-G2 gDNA amplifiziert. Die Primer wurden so designt, dass die Fragmente einen 300 – 322 bp langen homologen Überhang untereinander aufwiesen, während die äußeren Clusterfragmente einen 25 bp Überhang zum linearisierten pYWB2 trugen. pYWB2 wurde mit den Primern prJN080 und prJN091 per PCR linearisiert. Durch die Amplifikation des gesamten Vektors war es möglich jeweils 24 bp Überhang zu den äußeren Clusterfragmenten anzuhängen, sodass der gesamte homologe Bereich zwischen diesen und dem Vektor 51 bzw. 56 bp betrug. Durch diese längeren homologen Sequenzen sollte die Klonierung der Fragmente mit dem Vektor

vereinfacht werden. Mittels homologer Rekombination in *S. cerevisiae* und anschließender Vervielfältigung des Plasmids in *E. coli* konnte pJN014 (Abbildung 43A) gewonnen werden. Zur Kontrolle von pJN014 wurde ein Restriktionsverdau mit BamHI durchgeführt (Abbildung 43B; Erwartete Fragmente: 462, 714, 807, 932, 3550, 5186, 7178, 11082 bp). Nachdem pJN014 als korrekt bestätigt wurde, wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym SwaI linearisiert, gereinigt und zur Transformation von *A. nidulans* LO8030 benutzt. Die gDNA der weißen Transformanten (Abbildung 43D) wurde isoliert und durch PCR mit den Primern prJN064 und prJN082 konnte die Integration des *fog*-Clusters ins Genom von *A. nidulans* bestätigt werden (Abbildung 43C; Erwartetes Fragment: 1105 bp).

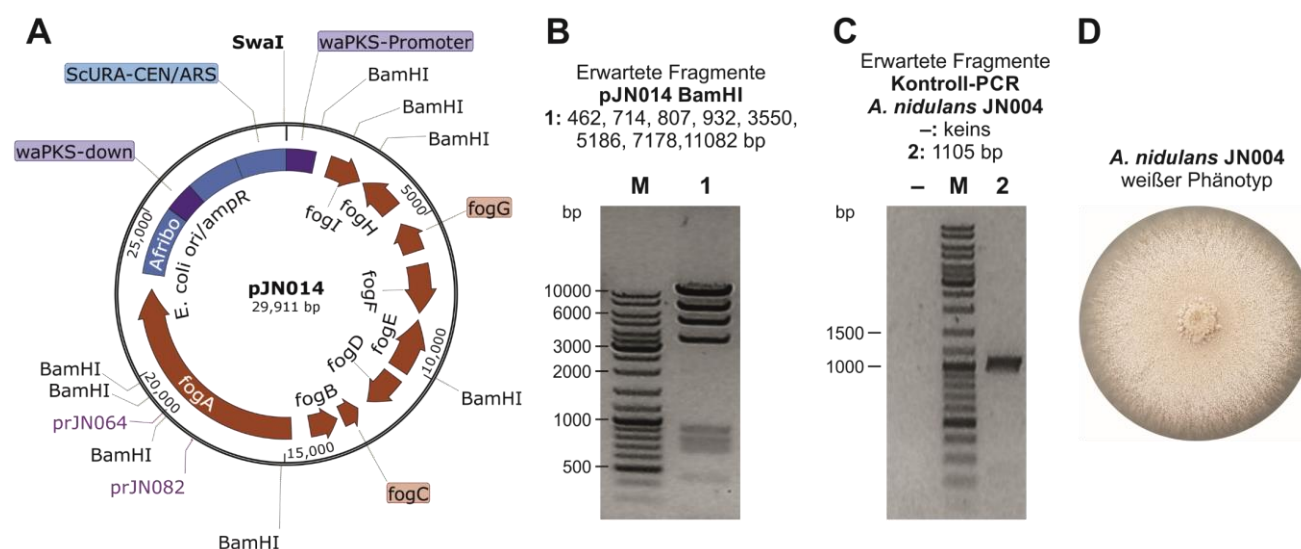
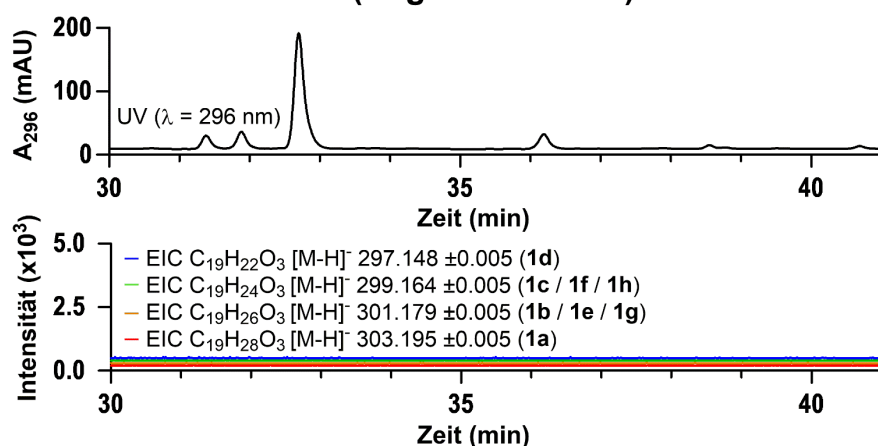
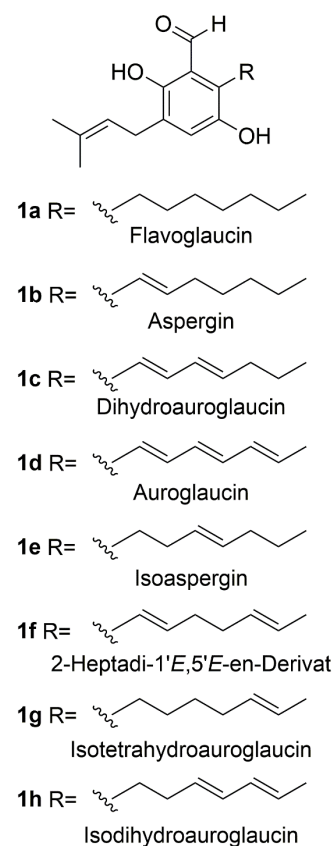
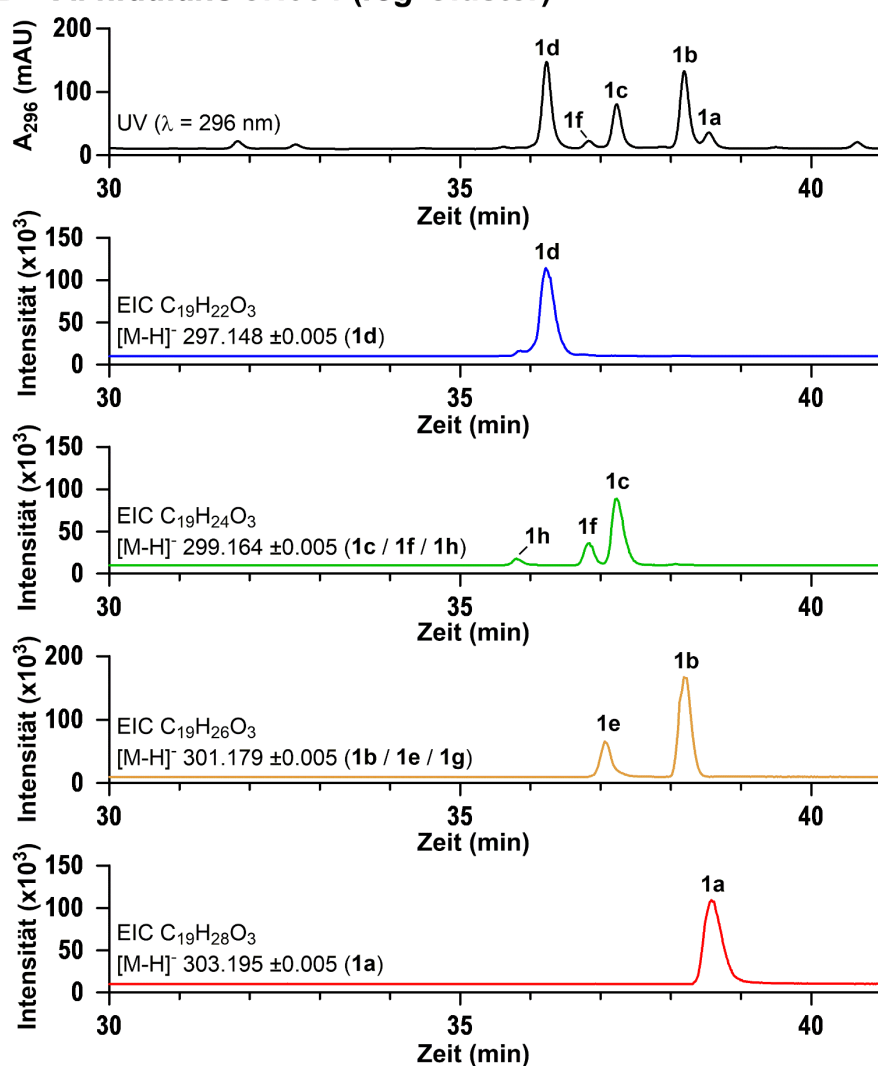


Abbildung 43: Kontrolle von pJN014 und dem *fog*-Cluster Expressionsstamm *A. nidulans* JN004

Plasmidkarte von pJN014 (**A**). Restriktionsverdau von pJN014 mit BamHI (Erwartete Fragmente: 462, 714, 807, 932, 3550, 5186, 7178, 11082 bp) (**B**). Kontroll-PCR für *A. nidulans* JN004 (Erwartetes Fragment: 1105 bp) (**C**). Weißer Phänotyp von *A. nidulans* JN004 (**D**).

Zur Untersuchung des Sekundärmetabolitprofils von *A. nidulans* JN004 wurden 25 g Reismedium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit ca. 1×10^7 Konidiosporen inokuliert und bei 25°C für maximal 14 Tage inkubiert. Eine Probe der Kultur wurde nach 10 Tagen mit Ethylacetat extrahiert und über LC-MS analysiert (Abbildung 44B). Als Negativkontrolle diente eine Kultur *A. nidulans* JN002, die unter gleichen Bedingungen inkubiert und extrahiert wurde (Abbildung 44A).

Im Extrakt der Probe konnten basierend auf ihren Retentionszeiten und Massen die Substanzen **1a** – **1f** detektiert werden. Während **1a** – **1d** die Hauptprodukte in diesem Stamm darstellten, wurden **1e** und **1f** in geringerer Menge produziert. Im Extrakt der Negativkontrolle konnte keines dieser Produkte beobachtet werden. Wie im Ursprungsorganismus *A. ruber* wurde hier kein **1g** beobachtet. **1h** konnte in niedriger Quantität nur mit Hilfe seines Massesignals im *extracted ion chromatogram* (EIC) nachgewiesen werden, obwohl **1h** in *A. ruber* nach **1a** und **1b** am meisten akkumulierte.

A. *A. nidulans* JN002 (Negativkontrolle)**B. *A. nidulans* JN004 (fog-Cluster)****Abbildung 44: LC-MS-Analyse des Rohextrakts aus dem fog-Cluster Expressionsstamm *A. nidulans* JN004**

In Extrakten der Negativkontrolle *A. nidulans* JN002 (A) sind sowohl im UV-Chromatogramm (schwarz), als auch in den EICs (blau, grün, orange, rot) keine Spuren der Salicylaldehydderivate zu entdecken. Im fog-Cluster Expressionsstamm *A. nidulans* JN004 (B) hingegen können die Substanzen 1a – 1f beobachtet werden. Die Signale der EICs korrespondieren mit den erwarteten Massen der Substanzen. 1h ließ sich nur als Massesignal detektieren.

Zur Isolierung und strukturellen Bestätigung der detektierten Substanzen wurden 10 x 250 g Reismedium in 2 L Fernbachkolben mit jeweils ca. 5×10^7 *A. nidulans* JN004 Konidiosporen inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 25°C für 14 Tage bevor die gesamten Kulturen mit Ethylacetat extrahiert wurden. Die Isolierung von **1a** – **1f** über eine Kieselgelsäule und semi-präparative HPLC, sowie die Strukturaufklärung mittels ^1H NMR wurden von Frau Dr. Huomiao Ran durchgeführt. Die Auswertung der Strukturdaten zu den Flavoglaucinanaloga und ihren Vorstufen wurden ebenso von Frau Dr. Ran durchgeführt und sind unserer gemeinsamen Publikation zu entnehmen.⁴⁰¹

Der Vergleich der Strukturdaten mit der Literatur bestätigten **1a**, **1b**, **1c** und **1d** jeweils als Flavoglaucin, Aspergin, Dihydroauroglaucin und Auroglaucin.^{92,103} Genauso konnten die Strukturen für Isoaspergin (**1e**) und 2-Heptadi-(1'*E*,5'*E*)-enyl-3,6-Dihydroxy-5-(3''-Methyl-2''-Butenyl)Benzaldehyd (**1f**) nachgewiesen werden.^{93,435} Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass der *fog*-Cluster für die Biosynthese von Flavoglaucin und seinen Analoga verantwortlich ist.

4.1.5 Biosynthese der ersten aromatischen Vorstufe von Flavoglaucin und seine Hydroxylierung

4.1.5.1 Heterologe Expression der HR-PKS FogA in *Aspergillus nidulans* LO8030

Zu Beginn einer Naturstoffbiosynthese wird das Kohlenstoffrückgrat des Moleküls gebildet. Im Falle von Flavoglaucin wird dieses Rückgrat durch eine Polyketidsynthase synthetisiert, die höchstwahrscheinlich durch das Gen *fogA* kodiert wird. Ein Abgleich der Aminosäuresequenz von FogA mit der NCBI *Conserved Domain Database* ergab folgende Domänenarchitektur für das Enzym: KS-AT-ACP-DH-ER-KR. Durch die Ketoreduktase-, Dehydratase- und Enoylreduktasedomäne ist es FogA theoretisch möglich das wachsende Polyketid partiell oder sogar komplett zu reduzieren. Damit kann FogA als hoch-reduzierende PKS (HR-PKS) klassifiziert werden. FogA besitzt, wie für HR-PKS üblich, keine Thioesterase- (TE) bzw. Claisen-Zyklase (CLC)-Domäne, was die Frage aufwirft, wie das Polyketid vom Enzym abgespalten wird.

Eine funktionelle Produktion von großen Proteinen wie Typ I-PKS stellt sich in *E. coli* sehr oft als problematisch heraus. Schneller realisierbar war daher die heterologe Expression von *fogA* in *A. nidulans* LO8030. Dazu wurde *fogA* zusammen mit 500 bp seiner 3'-UTR (als natürlicher Terminator für die Transkription) in zwei Fragmenten mit den Primerpaaren prJN061/064 und prJN062/063 von *A. ruber* QEN-0407-G2 gDNA amplifiziert. Die Primer wurden so designt, dass zwischen den Fragmenten ein homologer Bereich von 118 bp entsteht und an den Enden jeweils ein 25 bp Überhang zum linearisierten pYHL50 angehängt wird. Der Vektor pYHL50 wurde per PCR mit den Primern prJN059 und prJN060 linearisiert. Über HR in *S. cerevisiae* wurden die Fragmente mit dem linearisierten Vektor zum Plasmid pJN012 kloniert (Abbildung 45A). Durch einen Restriktionsverdau mit KpnI und XbaI wurde pJN012 auf seine Korrektheit überprüft (Abbildung 45B; Erwartete Fragmente: 779, 2189, 4147, 4849, 5615 bp). Das mit SwaI linearisierte pJN012 wurde für die Transformation von *A. nidulans* LO8030 benutzt. So wurde der Stamm *A. nidulans* JN001 geschaffen, der *fogA* unter Kontrolle des konstitutiven *gpdA*-Promotors exprimiert. Eine PCR mit den Primern prJN064 und prJN082 (Abbildung 45C; Erwartetes Fragment: 1105 bp) in Verbindung mit dem weißen Phänotyp des Stamms (Abbildung 45D) bestätigte die Integration von *gpdA(p)-fogA* am *wA*-Lokus.

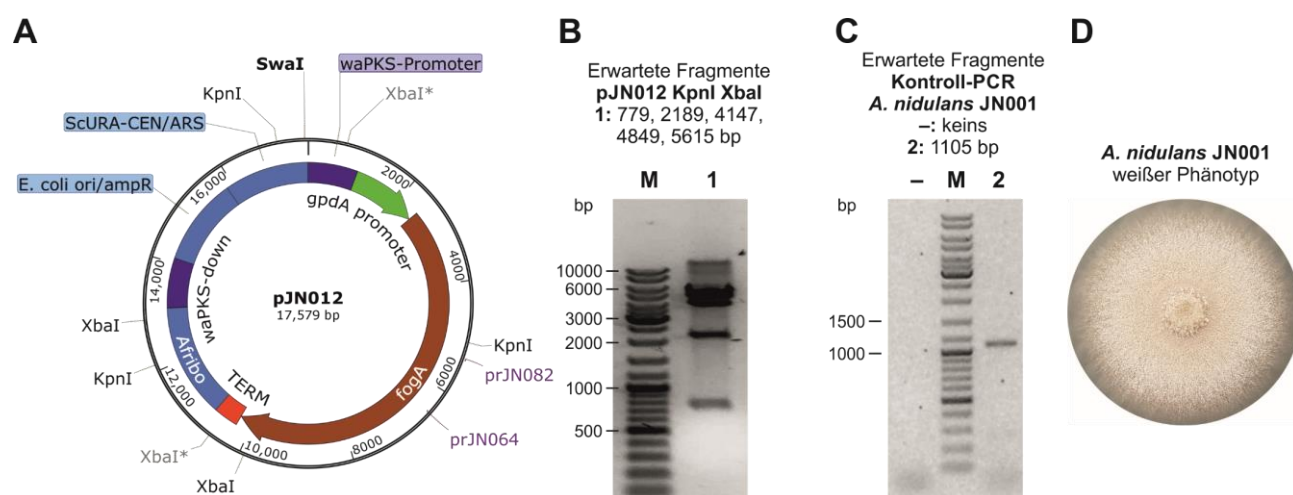


Abbildung 45: Kontrolle von pJN012 und dem *fogA*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN001

Plasmidkarte von pJN012 (A). Restriktionsverdau von pJN012 mit KpnI und XbaI (Erwartete Fragmente: 779, 2189, 4147, 4849, 5615 bp) (B). Kontroll-PCR für *A. nidulans* JN001 (Erwartetes Fragment: 1105 bp) (C). Weißer Phänotyp von *A. nidulans* JN001 (D).

Wie zuvor der Cluster-Expressionsstamm wurde auch *A. nidulans* JN001 auf 25 g Reismedium bei 25°C kultiviert. Eine Probe nach 7 Tagen wurde extrahiert und der Extrakt wurde über LC-MS analysiert. In dem Extrakt konnte ein Hauptprodukt **2d** und drei weitere kleinere Signale **3d** – **5d** entdeckt werden (Abbildung 46A). Mit einer Masse $[M - H]^-$ von m/z 269, 1387 konnte für **2d** eine wahrscheinliche Summenformel von $C_{14}H_{22}O_5$ (Errechnet: $[M - H]^-$ m/z 269,1389) vorausgesagt werden. Ohne Dimethylallylgruppe an C5 enthält das Rückgrat von Flavoglucin und seinen Vorstufen 14 Kohlenstoffatome, was mit dem detektierten Polyketid übereinstimmt. Im UV-Spektrum zeigte **2d** Absorption bei 258, 268 und 278 nm in einer Art Triplett (Abbildung 46C). Dieses Absorptionsmuster war unerwartet für potenzielle Aromaten was darauf hindeutete, dass das Polyketid noch nicht aromatisiert und möglicherweise offenkettig vorlag. **3d** – **5d** offenbarten zwar ähnliche UV-Spektren, allerdings unterschieden sie sich in ihrer Masse zu **2d** um jeweils 18 u was auf eine Eliminierung von H_2O schließen ließ (exemplarisch an **5d** gezeigt; Abbildung 46D).

Für die Isolierung der Substanzen wurde *A. nidulans* JN001 auf 15 x 250 g Reismedium in 2 L Fernbachkolben bei 25°C für 7 Tage inkubiert, bevor die Kulturen mit Ethylacetat extrahiert wurden. Aus dem Extrakt sollten mit Hilfe einer Kieselgelsäule und semi-präparativer HPLC die Substanzen **2d** – **5d** isoliert werden. Während der Isolierung wurde festgestellt, dass **2d** in Anwesenheit von Wasser leicht zu **3d** – **5d** konvertiert und nur diese im Anschluss stabil vorlagen. Durch Zugabe von etwas Extrakt in Wasser konnte diese Konversion bestätigt werden, dabei schien **5d** das Hauptprodukt der Wassereliminierung zu sein (Abbildung 46B). Die Strukturen der stabilen Wassereliminierungsprodukte **3d** – **5d** wurden durch eine Kombination von 1H -, ^{13}C -, HMQC-, HSQC-, 1H - 1H -NOESY- und 1H - 1H -COSY-NMR aufgeklärt. Teile der Isolierung, sowie die Strukturaufklärung wurden wie zuvor von Frau Dr. Huomiao Ran durchgeführt, deswegen sind die Strukturdaten nicht in dieser Arbeit zu finden, sondern unserer gemeinsamen Publikation zu entnehmen.⁴⁰¹

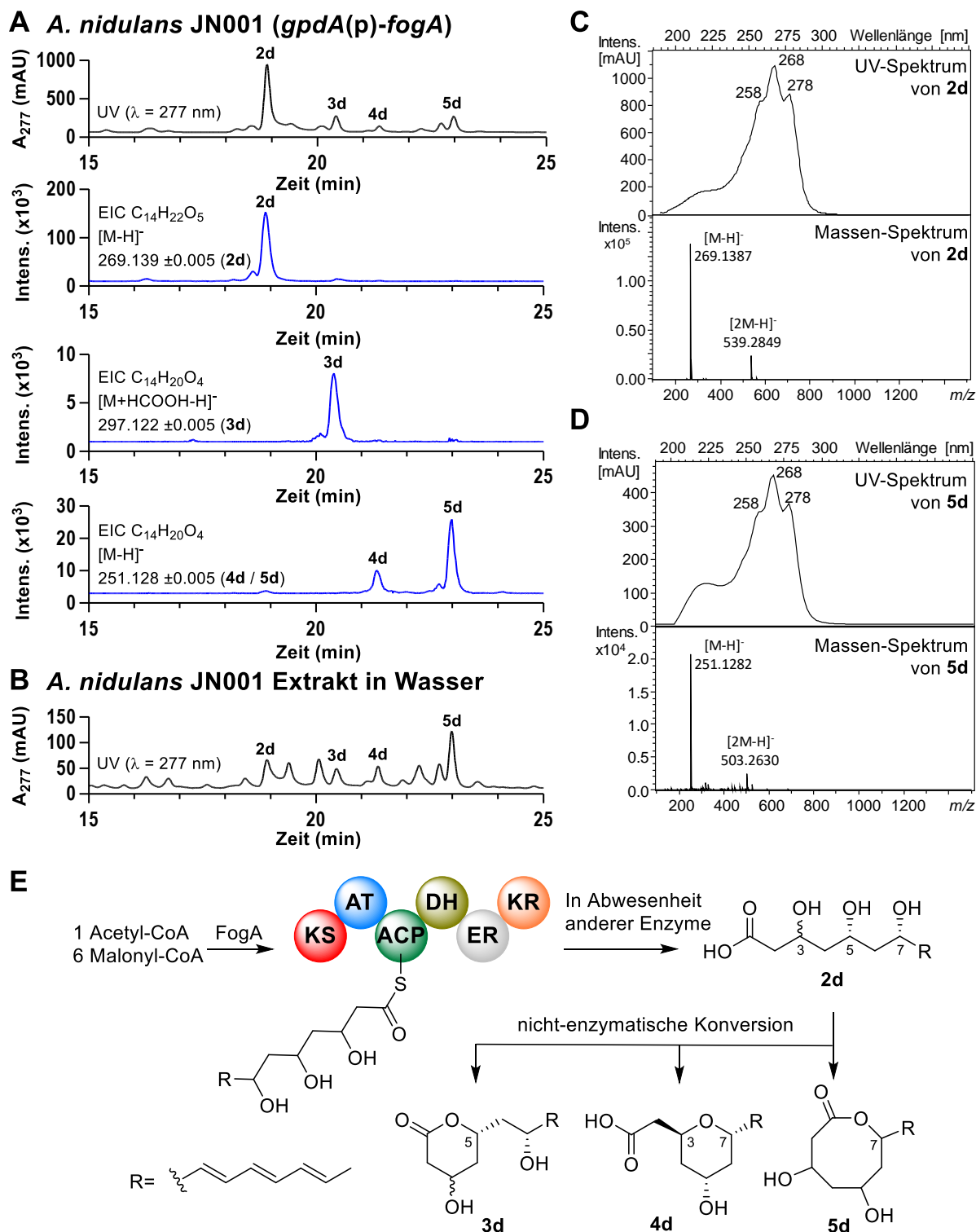


Abbildung 46: LC-MS Analyse des *fogA*-Expressionsstamms *A. nidulans* JN001 und postulierte Bildung von 2d – 5d

Die LC-MS Analyse des Extrakts von *A. nidulans* JN001 führte zur Detektion der Substanzen 2d – 5d (A). In wässriger Lösung konvertierte 2d spontan zu 3d – 5d (B). Die UV-Spektren von 2d (C) und der spontanen Konversionsprodukte (exemplarisch 5d) (D) wiesen dieselben Absorptionsmaxima auf, doch die Massen unterschieden sich um 18 u. FogA allein produziert ein offenkettiges Heptaketid 2a, das durch Wassereliminierung zu 3d – 5d zyklisiert (E).

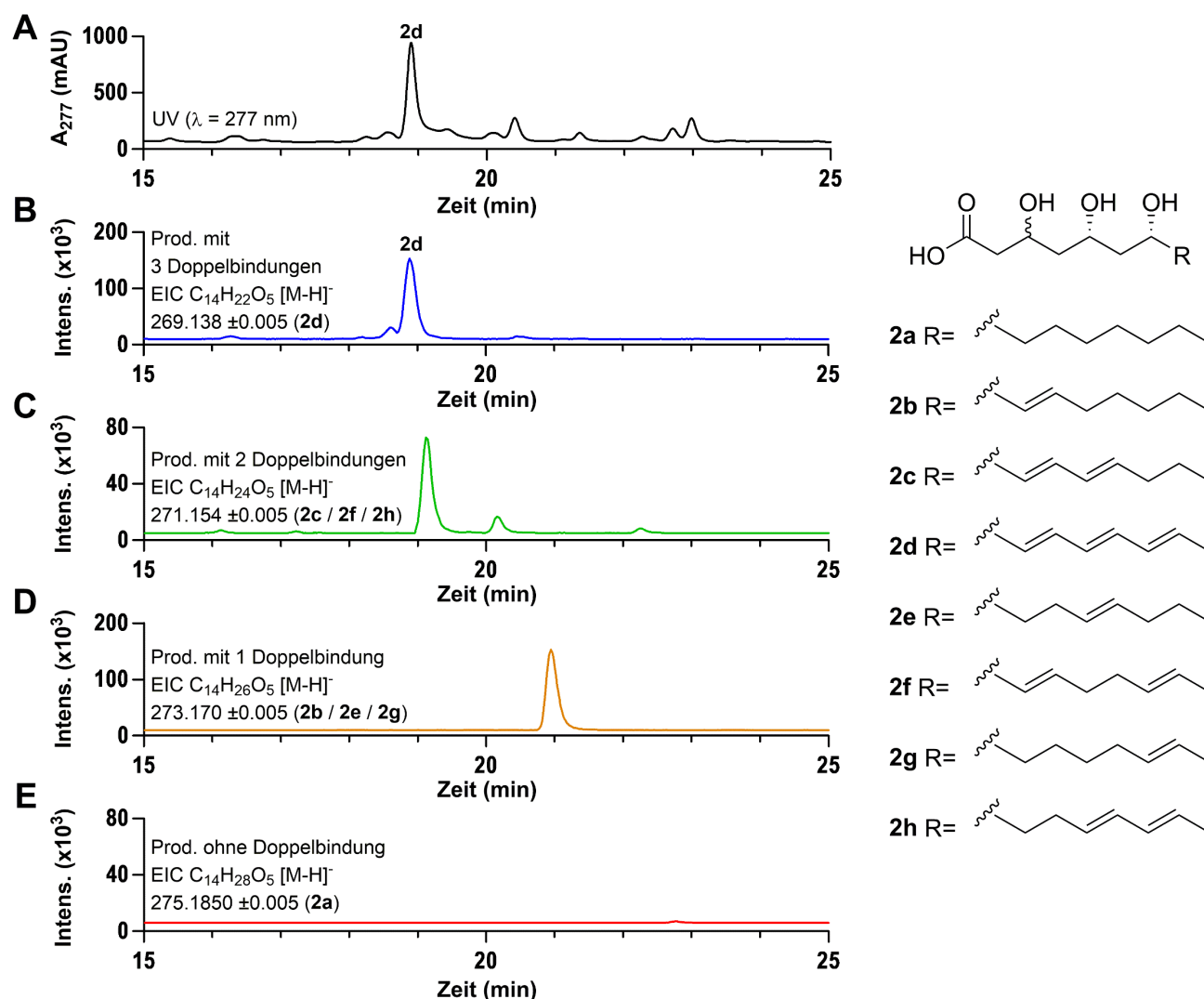


Abbildung 47: Nachweis von FogA-Produkten mit einer oder zwei Doppelbindungen durch LC-MS

Das Hauptprodukt von FogA **2d** mit komplett ungesättigtem initialen Triketid ist deutlich als UV-Signal (**A**) und im EIC (**B**) zu erkennen, während Derivate mit nur einer (**C**) oder zwei Doppelbindungen (**D**) höchstens in der Masse zu entdecken waren. **2a** mit komplett gesättigtem Rest konnte auch nicht durch MS detektiert werden (**E**).

Obwohl **2d** nicht in stabiler Form isoliert wurde, konnte aus den Strukturen der Konversionsprodukte auf das eigentliche Produkt von FogA geschlossen werden: **3d**, **4d** und **5d** stellten sich als Lacton- bzw. Tetrahydropyranderivate von (8*E*,10*E*,12*E*)-3,5,7-Trihydroxytetradeca-8,10,12-triensäure (**2d**) heraus. Offenbar war es FogA allein nicht möglich eine C2-C7-Zyklisierung zu veranlassen, um anschließend den aromatischen Kern des Polyketids zu bilden. Damit ein solcher Ringschluss möglich ist, müsste das Keton an C7 erhalten bleiben. Jedoch reduzierte FogA die ersten drei Ketideinheiten zu Alkenen und die nächsten drei zu Alkoholen, bevor das Produkt als offenkettige Säure **2d** durch chemische Hydrolyse vom Enzym freigesetzt wurde. Wassereliminierung führte dann zur spontanen Lactonisierung zwischen der Carboxyfunktion und C5 (**3d**) oder C7 (**5d**) bzw. zur Bildung eines Tetrahydropyrans zwischen C3 und C7 (**4d**) (Abbildung 46E). Vermutlich benötigt FogA noch mindestens ein weiteres Enzym, um eine ordnungsgemäße Zyklisierung und Aromatisierung zu gewährleisten.

In *A. ruber* und auch im *fog*-Cluster Expressionsstamm *A. nidulans* JN004 wurden Endprodukte des Clusters mit unterschiedlicher Sättigung der Heptylseitenkette gefunden (**1a** – **1f**). Die initialen drei Ketideinheiten des Hauptprodukts von FogA **2d**, das in Flavoglaucinanaloga den Hauptteil der Seitenkette bildet, waren komplett ungesättigt (Abbildung 47A und B). Spuren von Derivaten mit zwei oder einer Doppelbindung konnten bestenfalls in der Masse nachgewiesen werden (Abbildung 47C und D). Ein Derivat mit komplett gesättigtem Rest konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 47E). Das deutet darauf hin, dass nicht nur für die Zyklisierung, sondern auch für die komplette Reduktion der Seitenkette mindestens ein weiteres Enzym benötigt wird. FogB, FogD oder FogG als kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen könnten FogA in seiner Funktion komplementieren, um ein aromatisiertes Produkt mit einer komplett reduzierten Seitenkette zu erhalten.

4.1.5.2 Deletion von *fogA* in *Aspergillus nidulans* JN004

Analog zu den zuvor geplanten Deletionstudien in *A. ruber* QEN-0407-G2 diente der Expressionsstamm *A. nidulans* JN004 zur weiteren Aufklärung der Flavoglaucinbiosynthese. Aufgrund der Deletion von *nkuA*, einem Homolog zum menschlichen KU70-Gen, welches essenziell für die DNA-Reparatur via NHEJ ist,⁴³⁶ sind gezielte genetische Modifikationen durch HR mit hoher Frequenz in *A. nidulans* LO8030 auch ohne Split-Marker Methode zu erreichen (Abbildung 48).

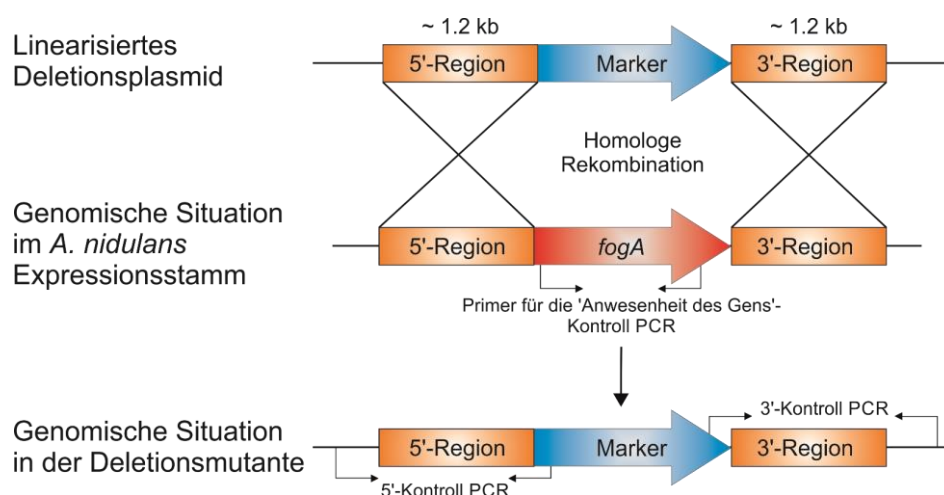


Abbildung 48: Schematische Darstellung der simplen Gendeletion im heterologen Expressionsstamm *A. nidulans* JN004 am Beispiel von *fogA*

Die Expression von *fogA* in *A. nidulans* zeigte, dass die HR-PKS allein nicht in der Lage ist, ein korrektes Intermediat in der Flavoglaucinbiosynthese zu bilden. Das stattdessen beobachtete **2d** und seine zyklisierten Derivate **3d** – **5d** schienen Shuntprodukte zu sein. Das ließ darauf schließen, dass neben FogA noch mindestens ein weiteres Enzym benötigt wird, um ein erstes aromatisches Intermediat zu bilden, welches durch die weiteren Enzyme des *fog*-Clusters zu den endgültigen Salicylaldehydderivaten umgesetzt wird. Durch die Deletion einzelner Gene im *fog*-Cluster Expressionsstamm *A. nidulans* JN004 sollte es möglich sein, die Gene bzw. Enzyme zu identifizieren, die dafür notwendig sind.

Die Expression des kompletten Clusters zeigte schon, dass FogA mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Biosynthese des Kohlenstoffgrundgerüsts verantwortlich ist. Bestärkt wurde diese Annahme durch

die Bildung eines C14-Polyketids im *fogA*-Überexpressionsstamm JN001 mit der gleichen Anzahl an Kohlenstoffatomen, wie für eine unprenylierte Vorstufe von Flavoglucin erwartet. Zum Beweis, dass FogA wirklich die vermutete Funktion erfüllt und nicht etwa ein vom Expressionsstamm *A. nidulans* synthetisiertes Produkt durch die anderen Enzyme des Clusters weiterverarbeitet wird, wurde *fogA* im Cluster Expressionstamm *A. nidulans* JN004 deletiert.

Von *A. ruber* QEN-0407-G2 gDNA wurde mit den Primern prJN202 und prJN203 ein 1200 bp langes Fragment stromaufwärts des Startcodons von *fogA* amplifiziert, während die Primer prJN204 und prJN205 dazu genutzt wurden 1168 bp stromabwärts des Stopcodons zu amplifizieren. Die Primer wurden so designt, dass an jedes Ende der Fragmente 30 bp Überhang zum Rückgrat des Vektors bzw. zu *AfpYrG* angehängt wurden. Das Markergen *AfpYrG* wurde vom Vektor pYH-wA-*AfpYrG* mit dem Primerpaar pJN115/116 vervielfältigt. Als Rückgrat des Deletionsplasmids dienten der *E. coli ori* und *Amp^R* zusammen mit dem *S. cerevisiae* CEN/ARS und dem URA3-Marker für die Vervielfältigung und Selektion in beiden Organismen. Dieses Rückgrat wurde von pYWB2 mit dem Primerpaar prJN117/118 amplifiziert. Die Klonierung der *AfpYrG*-Kassette zwischen die 5'- und 3'-Regionen von *fogA* mit dem Shuttlevektorrückgrat erfolgte über HR in *S. cerevisiae* HOD114-2B und anschließender Vervielfältigung in *E. coli* DH5 α . Das resultierende *fogA*-Deletionsplasmid pJN031 (Abbildung 49A) wurde durch einen Restriktionsverdau mit EcoRI und BamHI kontrolliert (Abbildung 49B; Erwartete Fragmente: 498, 1073, 1191, 1688, 3067 bp). Nach Linearisierung mit SwaI wurden *A. nidulans* JN004 Protoplasten mit pJN031 transformiert. Die resultierenden Transformanten konnten nicht mehr anhand eines weißen Phänotyps vorselektiert werden, da das wA-PKS-Gen durch die vorherige Integration des Clusters schon deletiert wurde. Deswegen erfolgte die Überprüfung der Transformanten ausschließlich über PCR. Dabei diente eine PCR auf gDNA von *A. nidulans* JN002 als Negativkontrolle

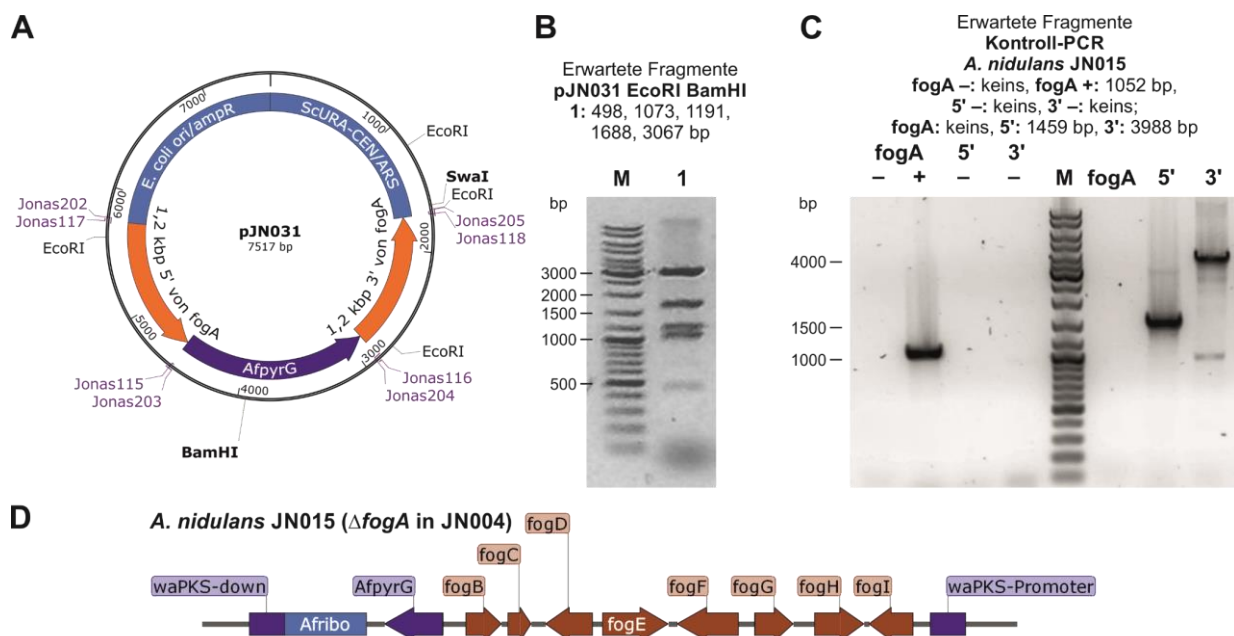


Abbildung 49: Kontrolle von pJN031 und dem $\Delta fogA$ Stamm *A. nidulans* JN015

Plasmidkarte von pJN031 (**A**). Restriktionsverdau von pJN031 mit EcoRI und BamHI (Erwartete Fragmente: 498, 1073, 1191, 1688, 3067 bp) (**B**). Kontroll-PCR für *A. nidulans* JN015 (Erwartete Fragmente: *fogA*: keins, 5': 1459 bp, 3': 3988 bp) (**C**). Genotyp von *A. nidulans* JN015 (**D**).

und auf gDNA von *A. nidulans* JN004 als Positivkontrolle. Mit dem Primerpaar prJN064/065 wurden die Transformanten auf die Anwesenheit von *fogA* überprüft (Erwartetes Fragment im Falle einer positiven Deletion: keins, bei negativen Transformanten: 1052 bp). Bei einer fehlenden Bande wurde der jeweilige Transformant mit zwei weiteren PCRs für die 5'- und die 3'-Region auf die korrekte Integration des Markergens getestet. Dazu wurden die Primerpaare prJN167/216 (Erwartetes Fragment: 1459 bp) und prJN168/249 (Erwartetes Fragment: 3988 bp) benutzt (Abbildung 49C). Der entstandene $\Delta fogA$ -Stamm trug die Bezeichnung *A. nidulans* JN015 (Abbildung 49D).

Wie zuvor für *A. nidulans* JN004 beschrieben (Kapitel 4.1.4.2) wurde *A. nidulans* JN015 auf 25 g Reis-medium bei 25°C für 10 Tage inkubiert. Eine mit Ethylacetat extrahierte Probe wurde via LC-MS analysiert. Als Kontrolle diente Extrakt des *fog*-Cluster Expressionsstamms JN004 (Abbildung 50A). Wie vermutet konnten im Extrakt der $\Delta fogA$ -Mutante kein Flavoglaucin oder Analoga nachgewiesen werden, was die Notwendigkeit von FogA zur Synthese des Kohlenstoffgrundgerüsts bestätigt (Abbildung 50C). Das Sekundärmetabolitprofil von JN015 glich dem Negativkontrollstamm JN002 (Abbildung 50B).

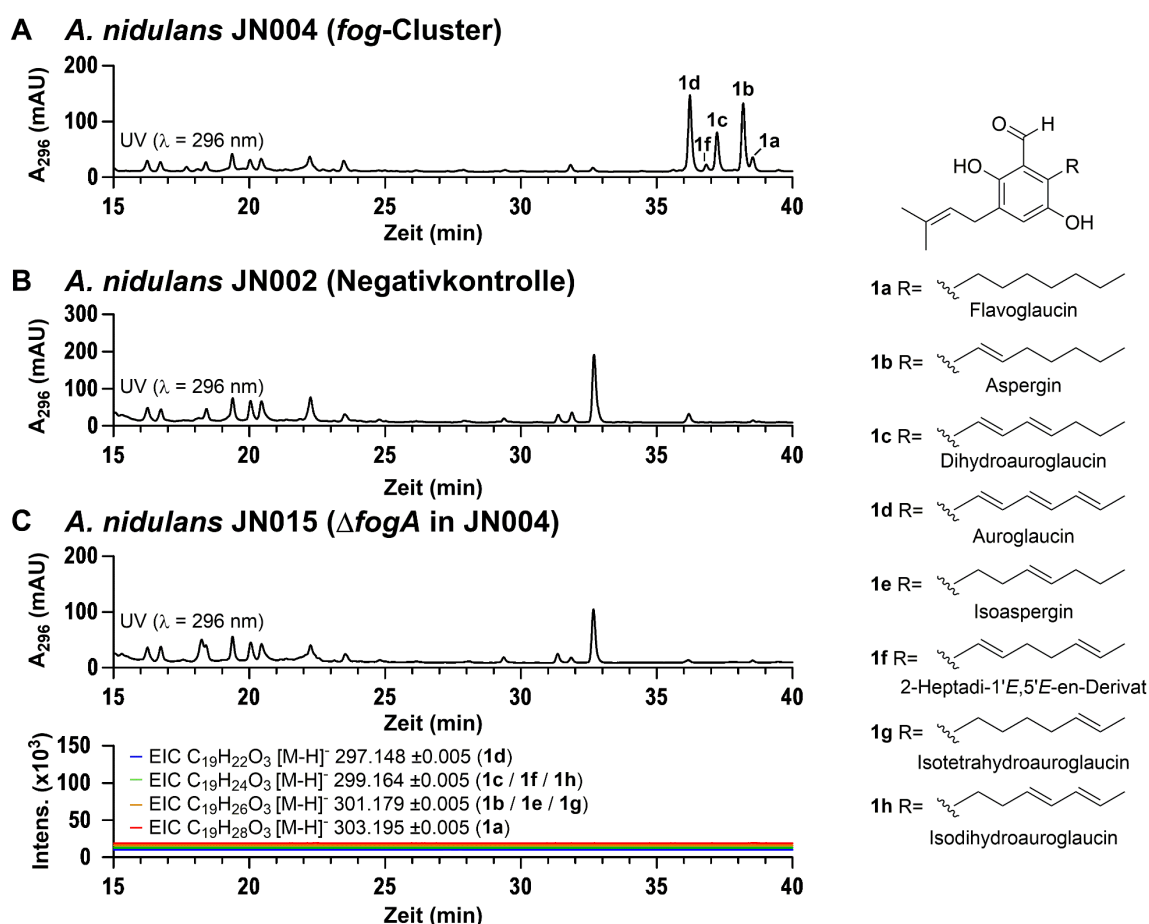


Abbildung 50: LC-MS-Analyse des Rohextrakts aus der $\Delta fogA$ -Mutante *A. nidulans* JN015

Während in Extrakten des *fog*-Cluster Expressionsstamms JN004 die Produkte **1a** – **1f** entdeckt werden konnten (**A**), schienen in der $\Delta fogA$ -Mutante JN015 keine Flavoglaucinanaloga gebildet zu werden (**C**). Sein Sekundärmetabolitprofil gleicht wieder dem der Negativkontrolle JN002 (**B**).

4.1.5.3 Deletion der Gene *fogB*, *fogC*, *fogD* und *fogG* in *Aspergillus nidulans* JN004

Als wahrscheinlichste Kandidaten für die Interaktion mit FogA zur korrekten Zyklisierung und weiteren Reduktion der Heptylseitenkette galten aufgrund ihrer potenziellen Dehydrogenase- oder Reduktaseaktivität die SDRs FogB, FogD und FogG. Eine Analyse mit der NCBI *conserved domain database* zeigte Ähnlichkeiten zwischen FogB und Enoyl-(ACP)-Reduktasen, welche dafür bekannt sind in der Fettsäurebiosynthese Doppelbindungen zu reduzieren.⁴³⁷ FogB zeigt weiterhin Ähnlichkeiten zu 3-Oxoacyl-(ACP)-Reduktasen, die β -Ketoacyl-ACP zu β -Hydroxyacyl-ACP reduzieren.^{438,439} Daher wurde spekuliert, dass FogB mit der Reoxidation der C7-Hydroxygruppe zum Keton für den Ringschluss des offenkettigen Polyketids sorgt oder für die Reduktion der übrigen Doppelbindungen des C₇-Rests verantwortlich ist. FogC konnte keine offensichtliche Funktion zugeordnet werden, aber da Enzyme mit Cupin-Domänen eine hohe Funktionsdiversität aufweisen, könnte FogC ebenso gut an der Bildung eines ersten richtigen Intermediats beteiligt sein.⁴⁴⁰

Zunächst sollten *fogB*, *fogC*, *fogD* und *fogG* einzeln deletiert werden. Die dazu notwendigen Deletionskonstrukte wurden analog zu pJN031 für den $\Delta fogA$ Stamm *A. nidulans* JN015 kloniert: ca. 1200 bp der 5'- und 3'-Regionen des jeweiligen Gens wurden mit 30 – 35 bp Überhang zum Backbone von pYWB2 und der *AfpYrG*-Kassette amplifiziert und über HR in *S. cerevisiae* zu Plasmiden kloniert. Die flankierenden Regionen von *fogB* wurden mit den Primerpaaren prJN127/128 und prJN292/293 amplifiziert. Das entstandene Plasmid pJN060 (Abbildung 51A) wurde durch einen Restriktionsverdau mit BamHI kontrolliert (Abbildung 51B; Erwartete Fragmente: 1584, 5965 bp). Die Transformation von *A. nidulans* JN004 Protoplasten mit Swal-linearisiertem pJN060 führte zum $\Delta fogB$ Stamm *A. nidulans* JN015 (Abbildung 51D). Wie für die $\Delta fogA$ -Mutante wurde über PCR die Abwesenheit des Gens überprüft und danach auf die richtige Integration der 5'- und 3'-Regionen getestet (Abbildung 51C). Als Matritze für die Negativkontrolle diente wie zuvor gDNA von *A. nidulans* JN002 und für die Positivkontrolle gDNA von *A. nidulans* JN004. Die Primer prJN153 und prJN154 binden in *fogB* und sollten bei einer erfolgreichen Deletion kein Fragment erzeugen (Erwartetes Fragment: keins, in Positivkontrolle: 1021 bp). Die Kontroll-PCR für die Flanken erfolgte mit den Primerpaaren prJN151/167 (Erwartetes Fragment: 1352 bp) und prJN152/168 (Erwartetes Fragment: 2168 bp).

Die Primerpaare prJN294/295 und prJN129/130 wurde zur Amplifikation der 5'- und 3'-Region von *fogC* benutzt. Die Fragmente wurden mit dem pYWB2-Backbone und der *AfpYrG*-Kassette zu pJN061 (Abbildung 52A) kloniert, das zur Überprüfung mit BamHI und EcoRI verdaut wurde (Abbildung 52B; Erwartete Fragmente: 498, 1353, 2296, 3402 bp). Aus der Transformation von *A. nidulans* JN004 mit Swal-geschnittenem pJN061 entstand der $\Delta fogC$ -Stamm JN035 (Abbildung 52D). Die Abwesenheit von *fogC* wurde mit den Primern prJN287/291 bestätigt (Erwartetes Fragment: keins; Positivkontrolle oder negativer Transformand: 659 bp). Die korrekte Integration der Flanken wurde mit den Primern prJN151/167 (Erwartetes Fragment: 2533 bp) und prJN152/168 (Erwartetes Fragment: 1245 bp) bestätigt (Abbildung 52C).

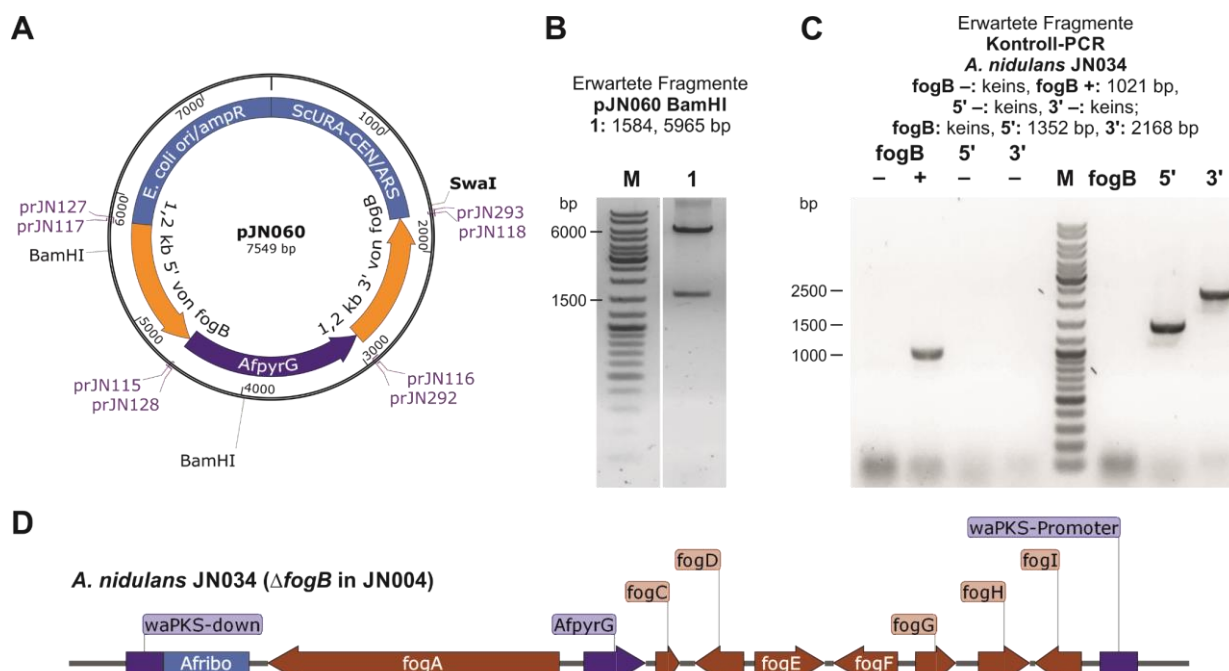


Abbildung 51: Kontrolle von pJN060 und dem $\Delta fogB$ -Stamm *A. nidulans* JN034

Plasmidkarte von pJN060 (A). Restriktionsverdau von pJN060 mit BamHI (Erwartete Fragmente: 1584, 5965 bp) (B). Kontroll-PCR für *A. nidulans* JN034 (Erwartete Fragmente: fogB: keins, 5': 1352 bp, 3': 2168 bp) (C). Weißer Phänotyp von *A. nidulans* JN034 (D).

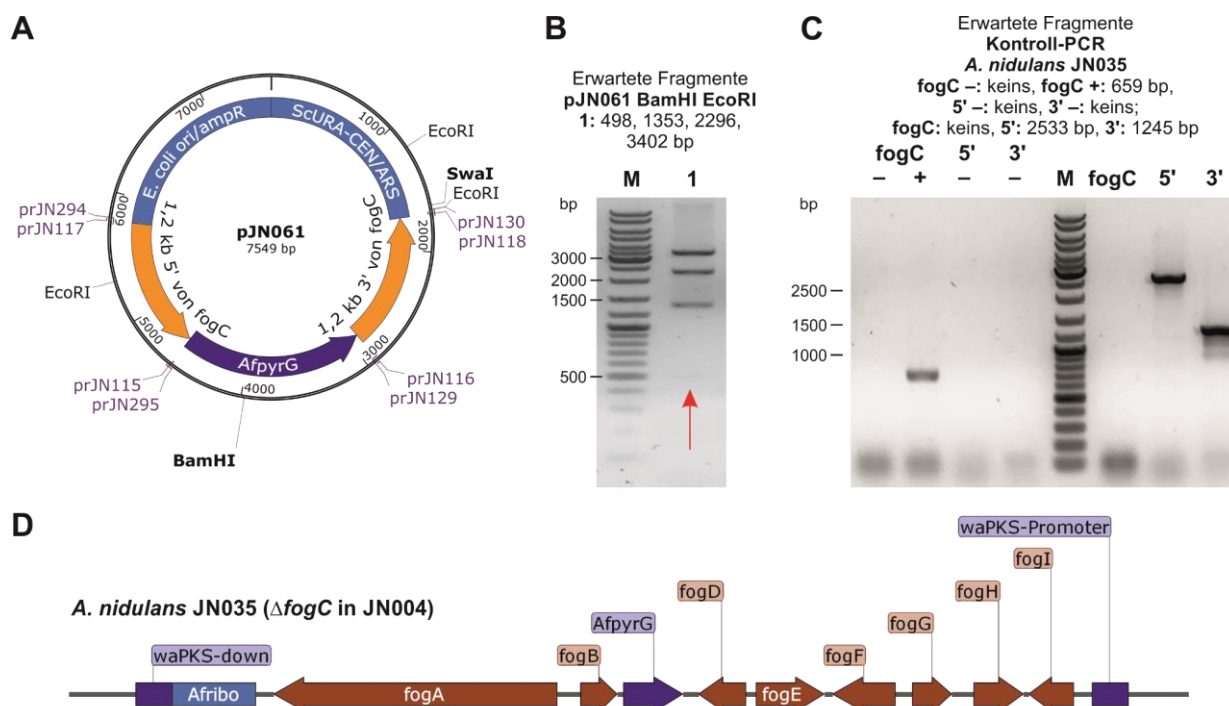


Abbildung 52: Kontrolle von pJN061 und dem $\Delta fogC$ -Stamm *A. nidulans* JN035

Plasmidkarte von pJN061 (A). Restriktionsverdau von pJN061 mit BamHI und EcoRI (Erwartete Fragmente: 498, 1353, 2296, 3402 bp) (B). Das 498 bp große Fragment ist hierbei nur schwach zu erkennen. Kontroll-PCR für *A. nidulans* JN035 (Erwartete Fragmente: fogB: keins, 5': 2533 bp, 3': 1245 bp) (C). Weißer Phänotyp von *A. nidulans* JN034 (D).

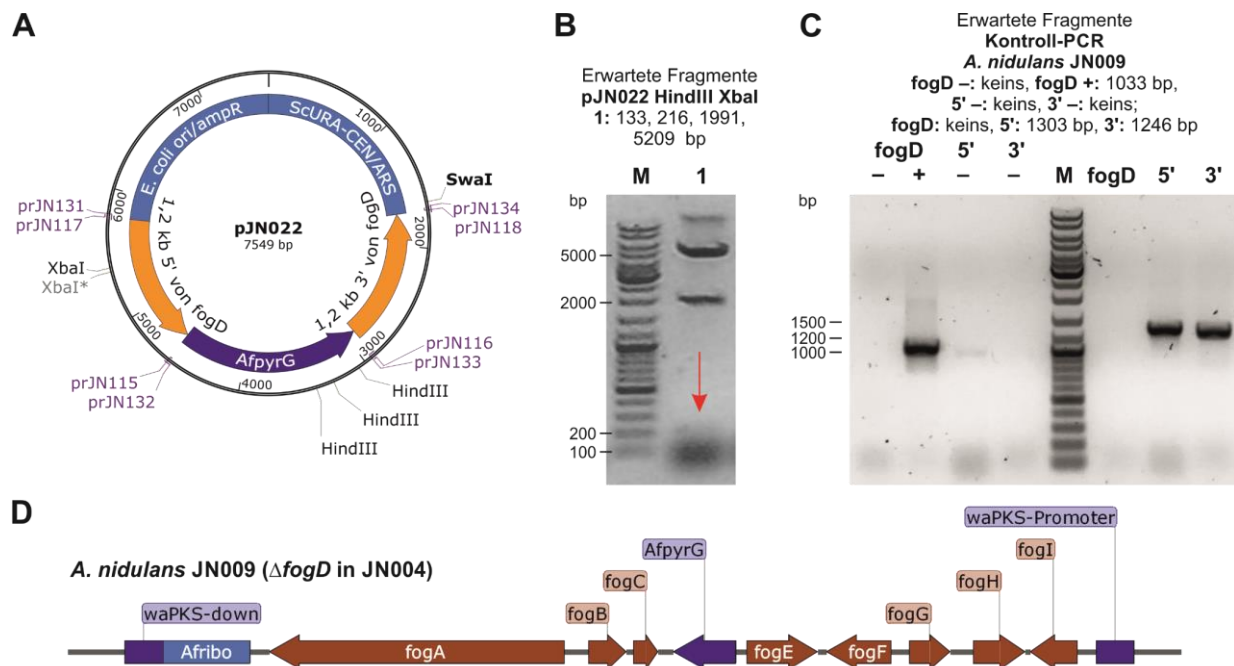


Abbildung 53: Kontrolle von pJN022 und dem $\Delta fogD$ -Stamm *A. nidulans* JN009

Plasmidkarte von pJN022 (A). Restriktionsverdau von pJN022 mit HindIII und XbaI (Erwartete Fragmente: 133, 216, 1991, 5209 bp) (B). Die 133 und 216 bp Fragmente werden teilweise von einer Primer- oder RNA-Wolke überschattet. Kontroll-PCR für *A. nidulans* JN009 (Erwartete Fragmente: fogD: keins, 5': 1303 bp, 3': 1246 bp) (C). Weißer Phänotyp von *A. nidulans* JN009 (D).

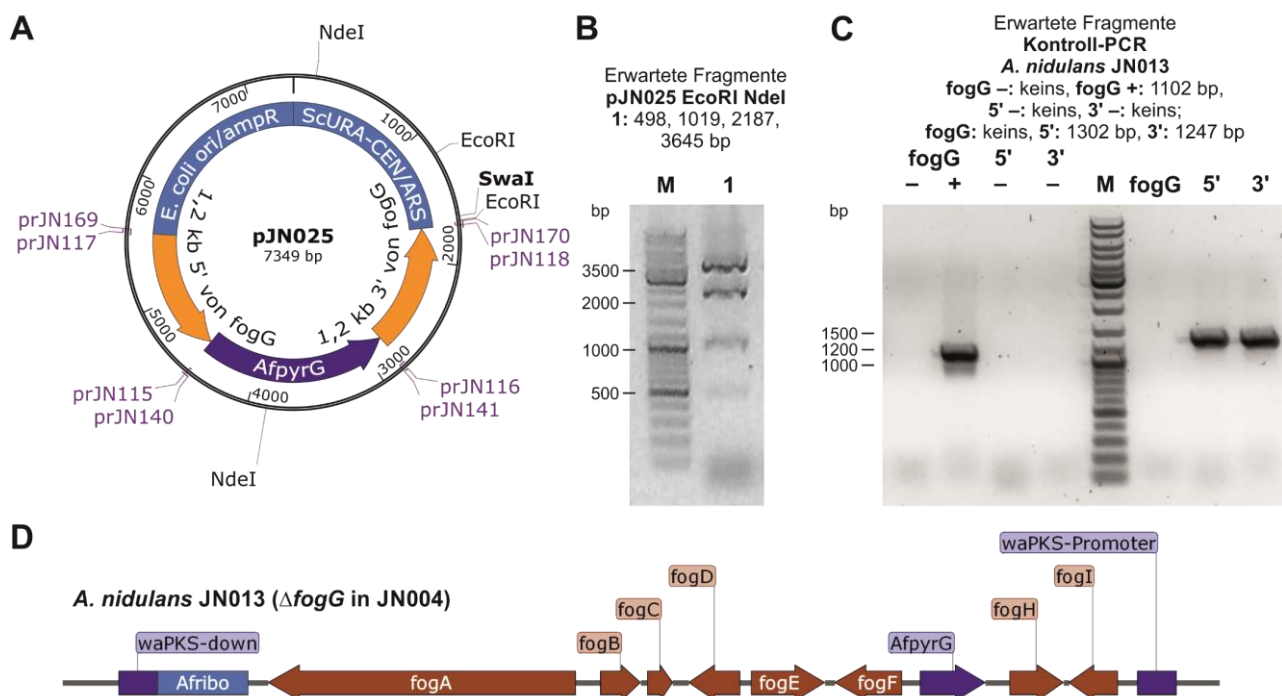


Abbildung 54: Kontrolle von pJN025 und dem $\Delta fogG$ -Stamm *A. nidulans* JN013

Plasmidkarte von pJN025 (A). Restriktionsverdau von pJN025 mit EcoRI und NdeI (Erwartete Fragmente: 498, 1019, 2187, 3645 bp) (B). Kontroll-PCR für *A. nidulans* JN013 (Erwartete Fragmente: fogG: keins, 5': 1302 bp, 3': 1247 bp) (C). Weißer Phänotyp von *A. nidulans* JN013 (D).

Die zur Deletion von *fogD* notwendigen flankierenden Bereiche wurden über PCR mit den Primern prJN131/132 und prJN133/134 gewonnen. Die Klonierung mit dem Rückgrat und dem Markergen führten zum Plasmid pJN022 (Abbildung 53A), dessen Fragmente nach Schneiden mit HindIII und XbaI zur Kontrolle des Vektors dienten (Abbildung 53; Erwartete Fragmente: 133, 216, 1991, 5209 bp). Durch Transformation des *fog*-Cluster Expressionsstamms JN004 mit Swal-linearisiertem pJN022 wurde der $\Delta fogD$ -Stamm JN009 erzeugt (Abbildung 53D). Das Fehlen von *fogD* konnte über PCR mit prJN157/158 (Erwartetes Fragment: keins; Positivkontrolle oder negativer Transformand: 1033 bp) nachgewiesen werden. Die Bestätigung für die korrekte Integration wurde durch PCR mit prJN155/167 (Erwartetes Fragment: 1303 bp) und prJN156/168 (Erwartetes Fragment: 1246 bp) erhalten (Abbildung 53C).

Die homologen Bereiche zum Austausch von *fogG* mit dem Marker *Afp_{pyrG}* wurden mit den Primern prJN140/169 und prJN141/170 vervielfältigt. Nach HR mit dem Plasmidrückgrat und dem Marker entstand der Vektor pJN025 (Abbildung 54A). Dieses Plasmid wurde über einen Verdau mit EcoRI und NdeI auf seine Richtigkeit überprüft (Abbildung 54B; Erwartete Fragmente: 498, 1019, 2187, 3645 bp). pJN025 wurde mit Swal linearisiert und zur Transformation von *A. nidulans* JN004 benutzt. Der daraus resultierende Stamm mit einer *fogG*-Deletion trug die Bezeichnung *A. nidulans* JN013 (Abbildung 54D). Durch eine PCR mit den Primern prJN165/166 wurde die Abwesenheit von *fogG* bestätigt (Abbildung 54C; Erwartetes Fragment: keins; Positivkontrolle oder negativer Transformand: 1102 bp). Die Inspektion des richtigen Integrationslokus erfolgte durch PCR mit prJN163/167 (Erwartetes Fragment: 1302 bp) und prJN164/168 (Erwartetes Fragment: 1247 bp).

Die Deletionsmutanten wurden wie zuvor beschrieben auf 25 g Reismedium bei Raumtemperatur inkubiert. Proben nach 10 Tagen wurden mit Ethylacetat extrahiert und der Extrakt wurde über LC-MS analysiert. Im Gegensatz zum *fog*-Cluster Expressionsstamm JN004 (Abbildung 55A) konnten nach der Deletion von *fogB* weder **1a** – **1f**, noch **2d** und seine Konversionsprodukte **3d** – **5d** in den UV-Chromatogrammen beobachtet werden. Dennoch waren die Massen kleiner Mengen der Endprodukte detektierbar. Genauso verhielten sich die Stämme *A. nidulans* JN035 und JN009 nach Deletion von *fogC* bzw. *fogD* (Abbildung 55C und D). Auch hier waren im UV-Chromatogramm keine Endprodukte oder Akkumulation von Intermediaten zu entdecken. Kleinste Spuren von **1a** und seinen Analoga wurden trotzdem in der Masse detektiert. Die Deletion von *fogG* hingegen schien keine Auswirkung auf die Produktion von **1a** – **1f** zu haben (Abbildung 55E). Alle Clusterendprodukte wurden in vergleichbarer Menge und Verhältnis zu JN004 gut sichtbar im UV-Chromatogramm detektiert.

Durch Inspektion der *extracted ion chromatograms* (EICs) des $\Delta fogB$ - und des $\Delta fogC$ -Stämme ist erkennbar, dass auch in diesen Mutanten **2d** gebildet wird (Abbildung 56C und D). Spuren von **2d** waren auch in der $\Delta fogD$ -Mutante detektierbar (Abbildung 56E). Im Vergleich dazu wurde im EIC des $\Delta fogA$ -Stammes JN015 keine Spur von **2d** gefunden (Abbildung 56B).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass neben FogA auch FogB, FogC und FogD benötigt werden, um ein erstes isolierbares Intermediat der Flavoglucinbiosynthese zu detektieren. Das wachsende Polyketid scheint von FogBCD modifiziert zu werden, während es an FogA gebunden ist, sonst wäre hypothetisch nach der Deletion der einzelnen Gene schon eine Zwischenstufe detektierbar.

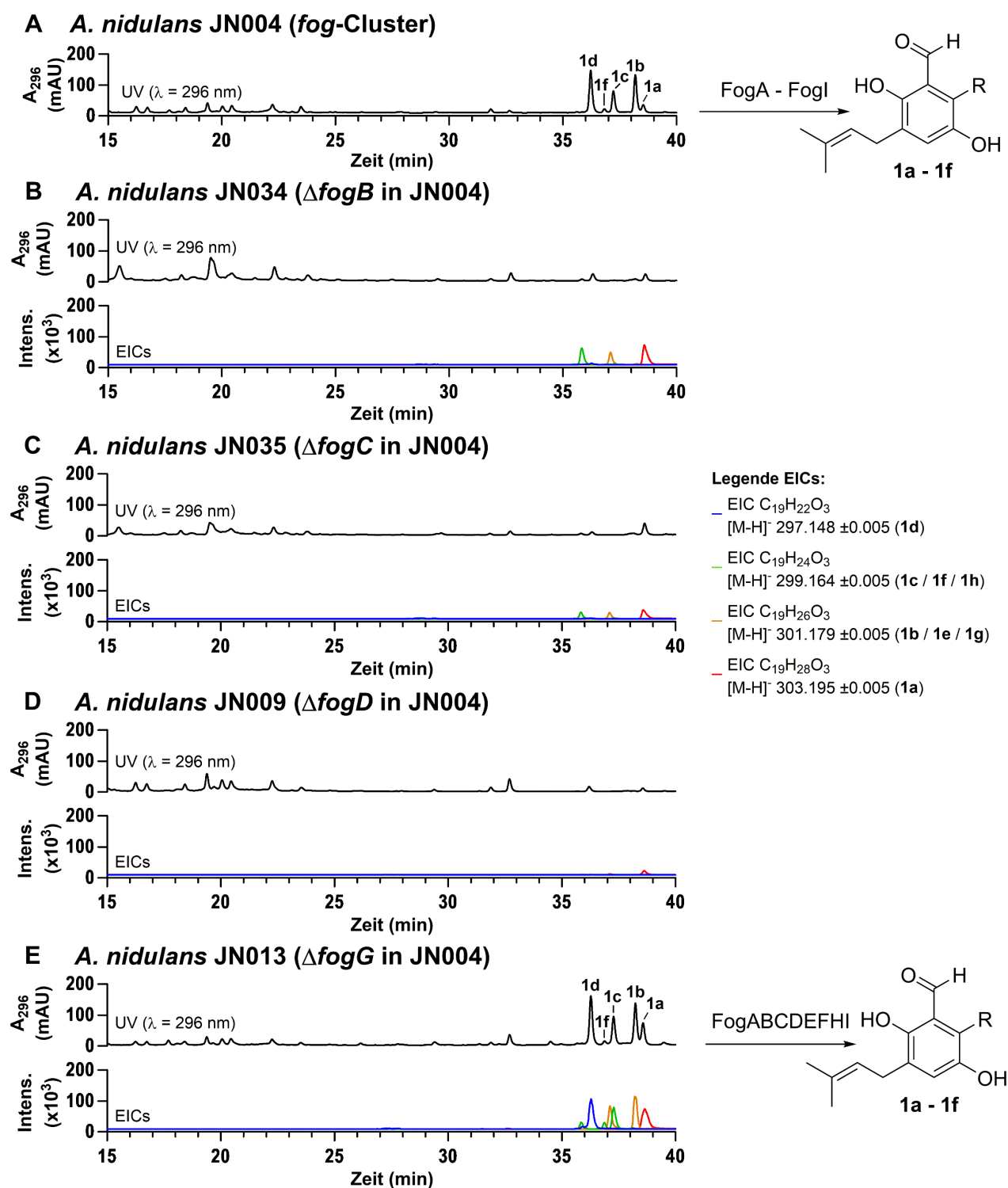


Abbildung 55: LC-MS-Analyse des Rohextrakts der $\Delta fogB$ -, $\Delta fogC$ -, $\Delta fogD$ - und $\Delta fogG$ -Stämme

Verglichen mit dem *fog*-Cluster Expressionsstamm JN004 (A), konnten nach Deletion von *fogB* (B), *fogC* (C) oder *fogD* (D) keine Endprodukte im UV-Chromatogramm entdeckt werden. Höchstens in der Masse sind kleine Spuren erkennbar. Nach Deletion von *fogG* war es dem Stamm immer noch möglich alle Clusterendprodukte zu bilden und es war kein Unterschied zu JN004 sichtbar (E).

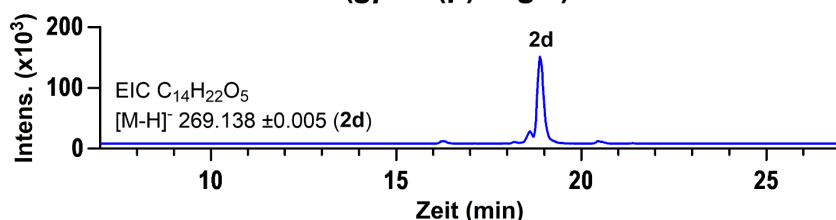
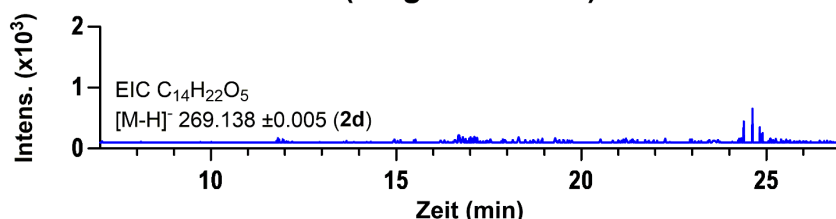
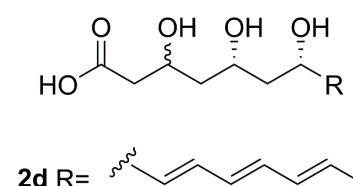
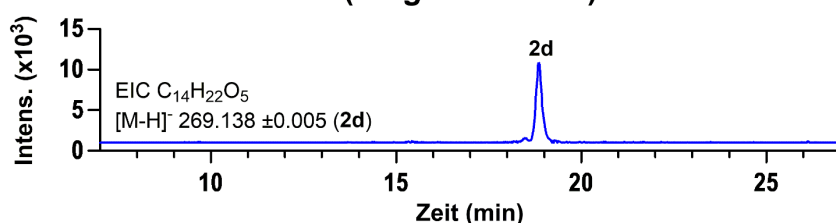
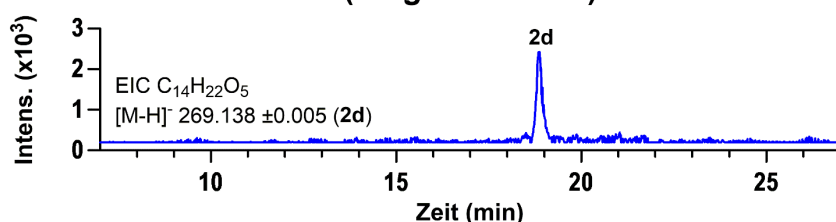
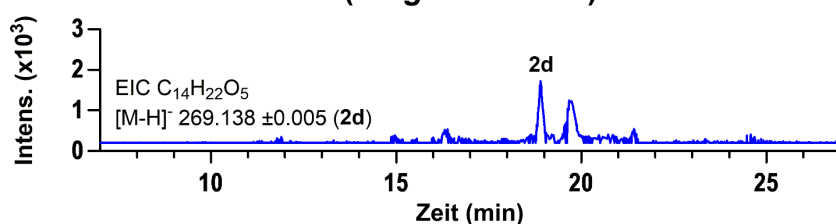
A *A. nidulans* JN001 (*gpdA*(p)-*fogA*)**B** *A. nidulans* JN015 ($\Delta fogA$ in JN004)**C** *A. nidulans* JN034 ($\Delta fogB$ in JN004)**D** *A. nidulans* JN035 ($\Delta fogC$ in JN004)**E** *A. nidulans* JN009 ($\Delta fogD$ in JN004)

Abbildung 56: EICs von **2d** im *fogA*-Expressionsstamm und in den *fogA*-, *fogB*-, *fogC*- und *fogD*-Deletionsmutanten.

Der *fogA*-Überexpressionsstamm JN001 produzierte das Hydrolyseprodukt **2d** in großer Menge (**A**), während nach Deletion von *fogA* erwartungsgemäß kein **2d** mehr vorhanden war (**B**). Auch im *fogB*- und *fogC*-Deletionsstamm *A. nidulans* JN034 (**C**) bzw. JN035 (**D**) konnte **2d** eindeutig entdeckt werden. Die *fogD*-Deletionsmutante JN009 zeigte nur geringe Spuren von **2d** (**E**).

Die hohe Akkumulation von **2d** im *fogA*-Überexpressionsstamm JN001 (Abbildung 56A) und die geringeren Mengen in den $\Delta fogB$ -, $\Delta fogC$ - und $\Delta fogD$ -Mutanten könnte durch die unterschiedlichen Expressionslevel von *fogA* zu erklären sein. Im Stamm JN001 steht *fogA* allein unter Kontrolle des starken konstitutiven *gpdA*-Promotors, während in den Deletionsstämmen der native Promotor vor *fogA* erhalten blieb. Eine höhere Abundanz der PKS selbst resultierte vermutlich in einer erhöhten Menge des Hydrolyseprodukts **2d**, wenn das Polyketid nicht weiter durch FogBCD modifiziert wurde.

4.1.5.4 Deletion von *fogE* in *Aspergillus nidulans* JN004

Das Gen *fogE* kodiert für ein Cytochrom P450 Enzym, welches vermutlich die Hydroxylierung eines aromatischen Intermediaten an C3 katalysiert. Zur Bestätigung seiner Funktion wurde *fogE* im Cluster Expressionsstamm *A. nidulans* JN004 deletiert. Das Deletionsplasmid wurde dazu wie zuvor beschrieben kloniert. Die Flanken wurden mit den Primerpaaren prJN123/124 und prJN125/126 amplifiziert, bevor sie mit *AfpYrG* und dem Vektorrückgrat über HR zu pJN020 kloniert wurden (Abbildung 57A). pJN020 wurde durch Restriktionsverdau mit HindIII kontrolliert (Abbildung 57B; Erwartete Fragmente: 133, 216, 1301, 1736, 4163 bp). Der $\Delta fogE$ -Stamm wurde als *A. nidulans* JN007 bezeichnet (Abbildung 57D). Das Fehlen von *fogE* wurde *via* PCR mit den Primern prJN149/150 bestätigt (Abbildung 57C; Erwartetes Fragment: keins, in Positivkontrolle: 1036 bp). Die Primerpaare prJN147/167 (Erwartetes Fragment: 1327 bp) und prJN148/168 (Erwartetes Fragment: 1257 bp) wurden zur Überprüfung der richtigen Integration der Flanken benutzt.

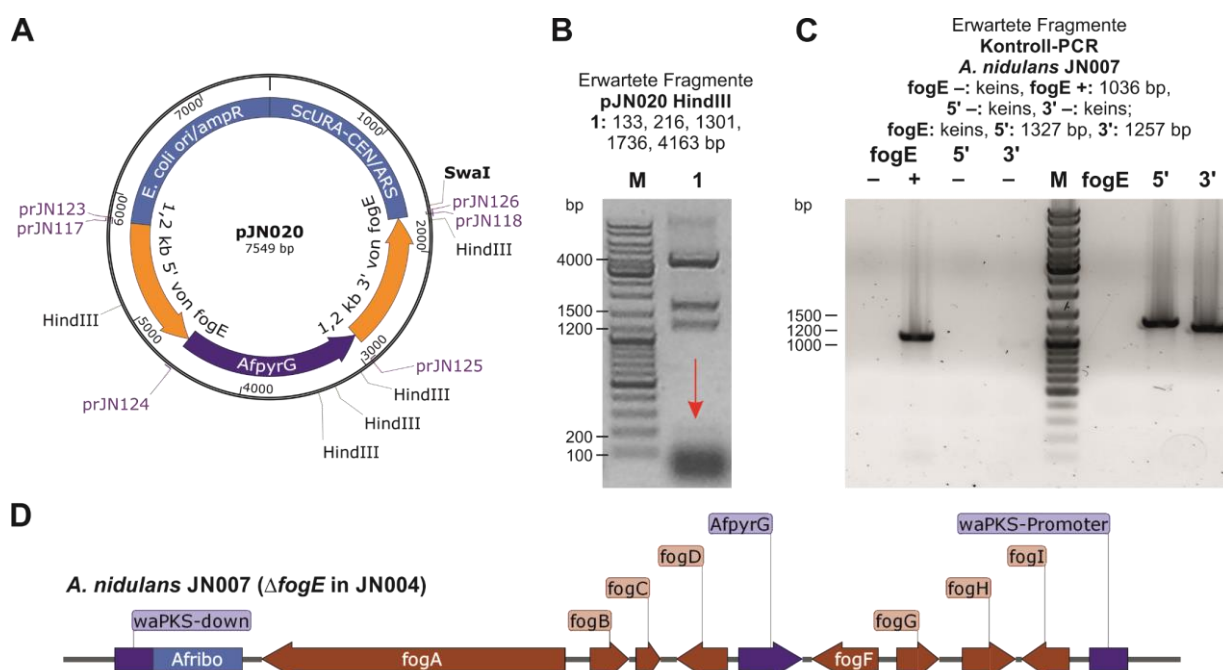
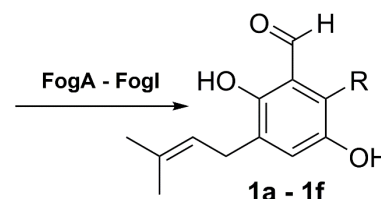
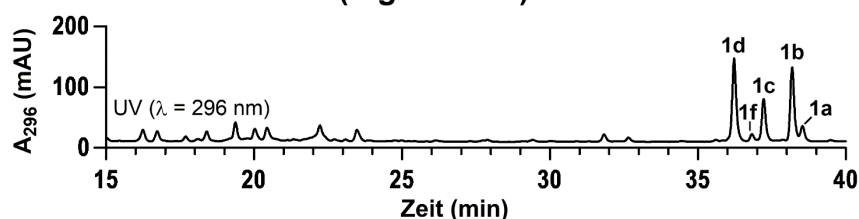
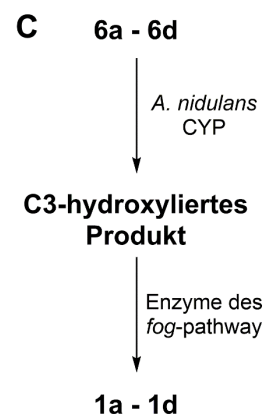
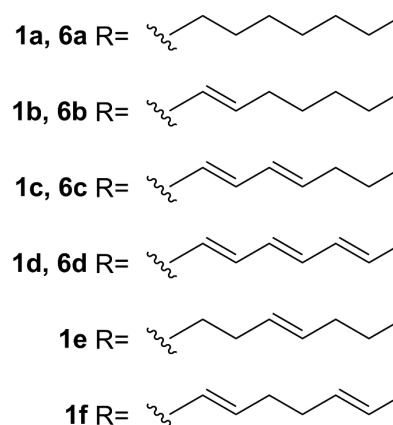
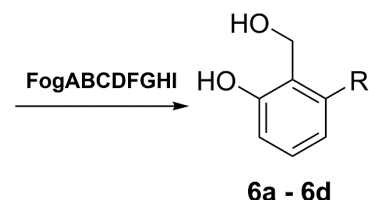
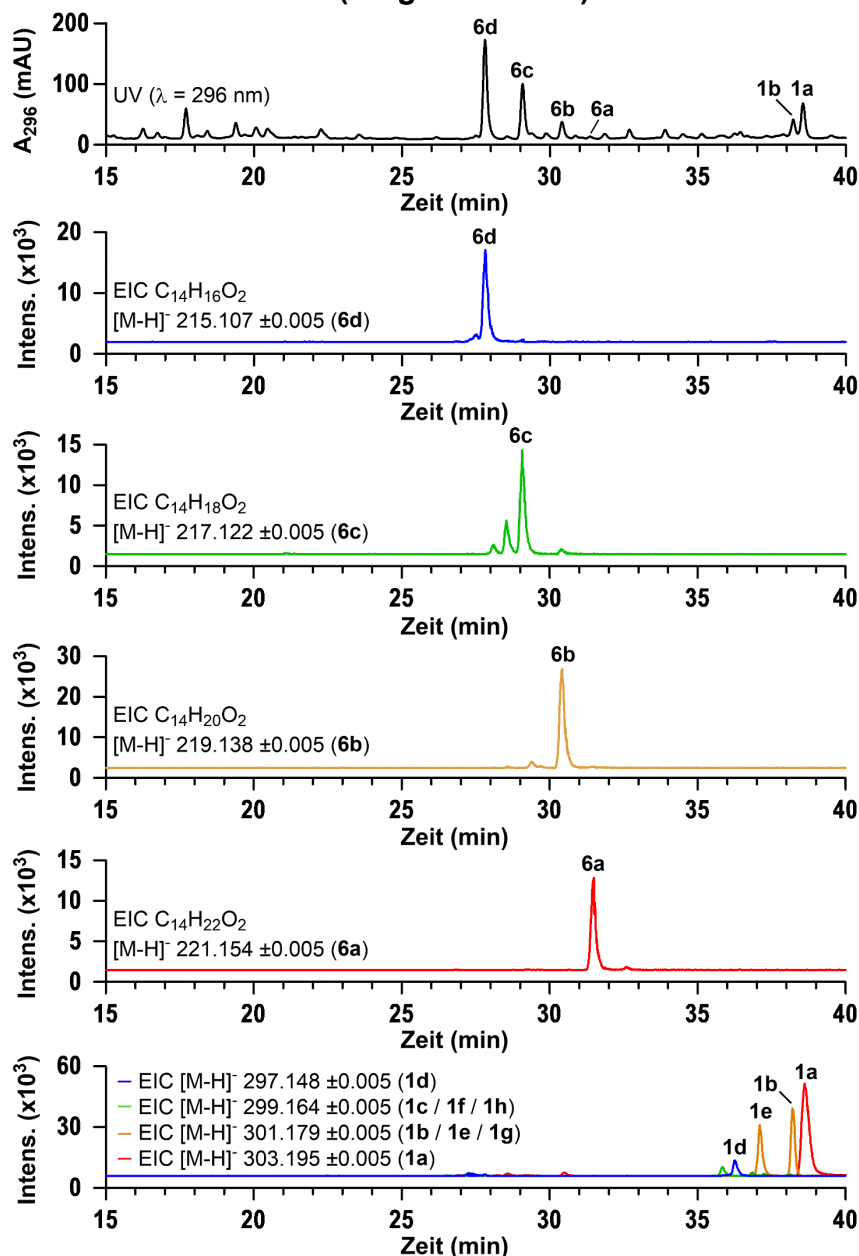


Abbildung 57: Kontrolle von pJN020 und dem $\Delta fogE$ -Stamm *A. nidulans* JN007

Plasmidkarte von pJN020 (A). Restriktionsverdau von pJN025 mit HindIII (Erwartete Fragmente: 133, 216, 1301, 1736, 4163 bp) (B). Die kleineren Banden sind teilweise von einer Primerwolke/RNA verdeckt. Kontroll-PCR für *A. nidulans* JN007 (Erwartete Fragmente: fogE: keins, 5': 1327 bp, 3': 1257 bp) (C). Weißer Phänotyp von *A. nidulans* JN007 (D).

Zur Überprüfung seines Sekundärmetabolitprofils wurde der $\Delta fogE$ -Stamm JN007 auf 25g Reismedium bei 25°C für 10 Tage inkubiert. Eine Probe der Kultur nach 10 Tagen wurde mit Ethylacetat extrahiert und über LC-MS analysiert. Verglichen mit dem *fog*-Cluster Expressionsstamm *A. nidulans* JN004 (Abbildung 58A) bildete der $\Delta fogE$ -Stamm noch immer die Clusterendprodukte **1a** und **1b**. **1c** – **1f** wurden nur noch als Spuren in der Masse beobachtet (Abbildung 58B). Stattdessen konnte die Anwesenheit neuer Substanzen beobachtet werden. Das größte Signal gehörte zu der Substanz **6d** deren Masse $[M - H]^- m/z$ 215.1073 einer errechneten Summenformel von $C_{14}H_{16}O_2$ ($[M - H]^- m/z$ 215.1067) entspricht. Die Massen der Stoffe **6c** ($[M - H]^- m/z$ 217.1233; errechnet:

A. *A. nidulans* JN004 (fog-Cluster)**B. *A. nidulans* JN007 ($\Delta fogE$ in JN004)****Abbildung 58: LC-MS-Analyse des Rohextrakts der $\Delta fogE$ -Mutante *A. nidulans* JN007**

Verglichen mit dem Cluster Expressionsstamm JN004 (A) wies der $\Delta fogE$ -Stamm JN007 (B) die neuen Produkte **6a – 6d** auf. Die Clusterendprodukte **1a** und **1b** wurden in signifikanter Menge aber auch in diesem Stamm produziert. Es ist wahrscheinlich, dass ein *A. nidulans* Enzym die Aufgabe von FogE teilweise übernimmt und das hydroxylierte Produkt von den restlichen Enzymen des fog-Clusters zu den Endprodukten umgesetzt werden (C).

$C_{14}H_{18}O_2$: $[M-H]^-$ m/z 217.1223), **6b** ($[M-H]^-$ m/z 219.1385; errechnet: $C_{14}H_{20}O_2$: $[M-H]^-$ m/z 219.1380) und **6a** ($[M-H]^-$ m/z 221.1583; errechnet: $C_{14}H_{22}O_2$: $[M-H]^-$ m/z 221.1536) waren jeweils um etwa 2 u größer, was auf eine unterschiedliche Anzahl an Doppelbindungen hinwies, wie es für die C₇-Seitenkette von Flavoglaucin (**1a**) und seinen Vorläufermolekülen zu erwarten war. Die errechneten Summenformeln wiesen auf nur zwei Sauerstoffatome pro Molekül hin. Basierend auf den Daten für die Expression von FogA allein (Kapitel 4.1.5.1) wurde postuliert, dass auch das erste aromatische Intermediat vor der Hydroxylierung an C3 als Carbonsäure von der PKS freigesetzt wird. Das C6-Hydroxyl ist durch die Polyketidsynthese schon nativ am Molekül vorhanden und ist mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Produkt eines modifizierenden Enzyms. Die Intermediate besäßen in diesem Fall drei Sauerstoffatome. Alternativ war auch denkbar, dass eine durch FogB, FogC oder FogD katalysierte reduktive Freisetzung des Polyketids direkt zur Bildung eines Salicylaldehyds mit zwei Sauerstoffatomen führt.

Zur Isolierung der neuen Intermediate **6a** – **6d** wurde *A. nidulans* JN007 auf 10 x 250 g Reismedium in 2 L-Fernbachkolben für 10 Tage bei 25°C inkubiert. Die Isolierung und Strukturaufklärung mittels einer Kombination von ¹H-, ¹³C-, HMQC-, HSQC-, und HMBC-NMR wurde von Frau Dr. Huomiao Ran durchgeführt. Die Strukturdaten sind unserer gemeinsamen Publikation zu entnehmen.⁴⁰¹ **6a**, **6b**, **6c** und **6d** wurden als 2-Alkyl-Salicylalkohole mit keiner, einer, zwei oder drei Doppelbindungen an der Heptylseitenkette identifiziert (Abbildung 58). Diese aromatischen Intermediate wiesen keine Hydroxylierung an C3 auf, was ein starkes Indiz dafür ist, dass die CYP FogE die vorgeschlagene Monooxygenasefunktion übernimmt.

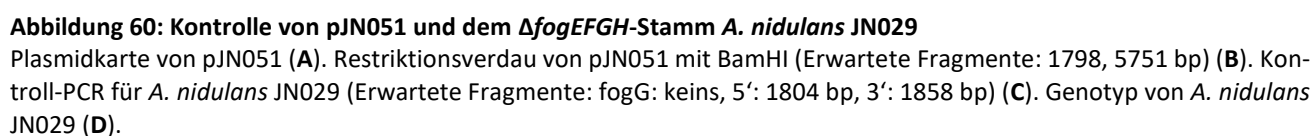
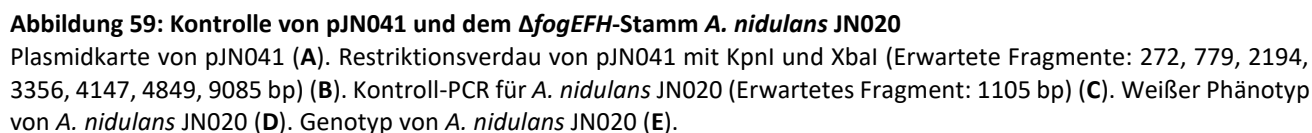
Obwohl mit der Deletion von *fogE* eine Hydroxylierung an C3 theoretisch ausgeschlossen ist und dies durch Akkumulation der nicht-hydroxylierten Intermediate **6a** – **6d** bestätigt wurde, konnten dennoch Clusterendprodukte nachgewiesen werden. Es ist denkbar, dass ein intrinsisches Enzym des heterologen Expressionsorganismus *A. nidulans* die Funktion von FogE zumindest teilweise komplementiert. Die von dem *A. nidulans*-Enzym hydroxylierten Produkte werden durch die restlichen Gene des *fog*-Clusters anschließend weiter verstoffwechselt (Abbildung 58C).

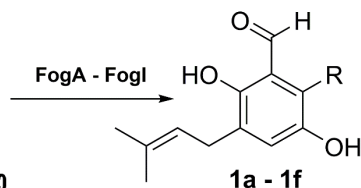
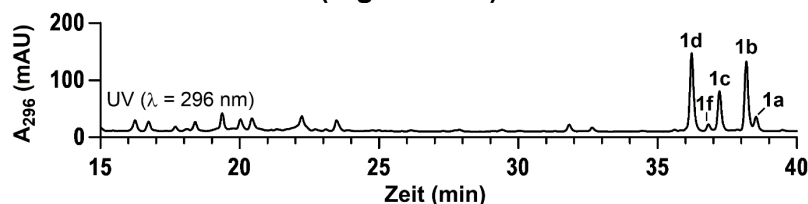
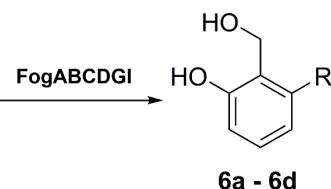
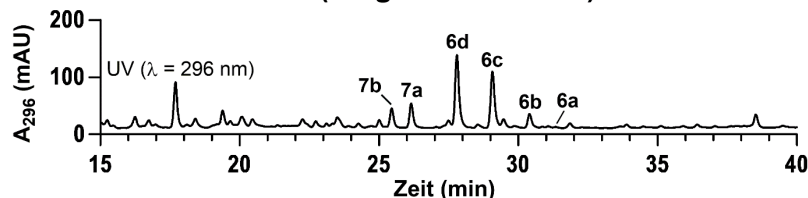
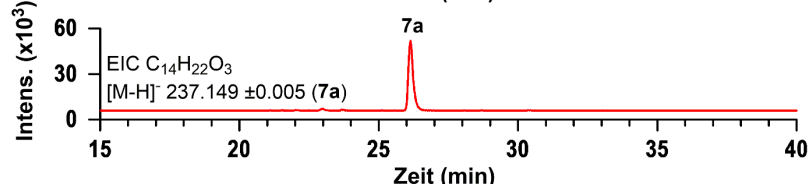
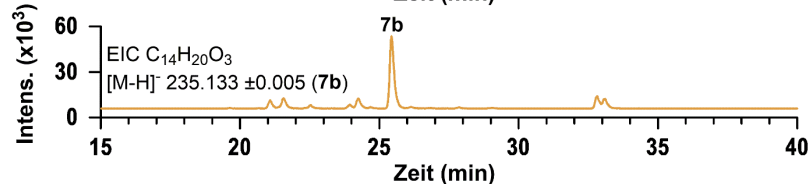
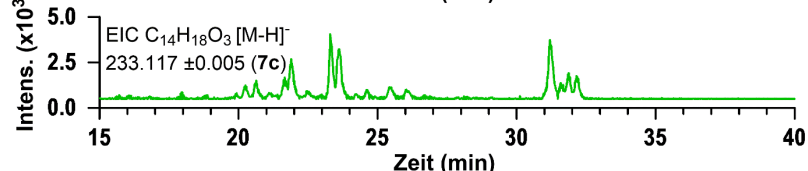
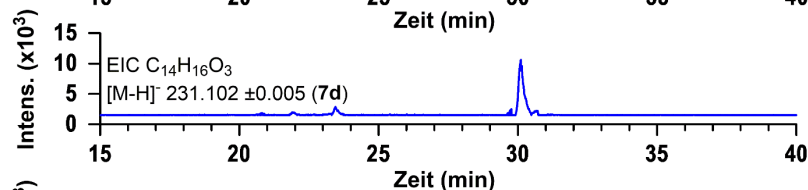
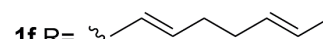
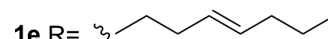
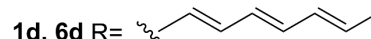
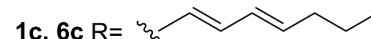
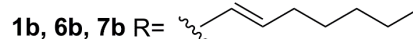
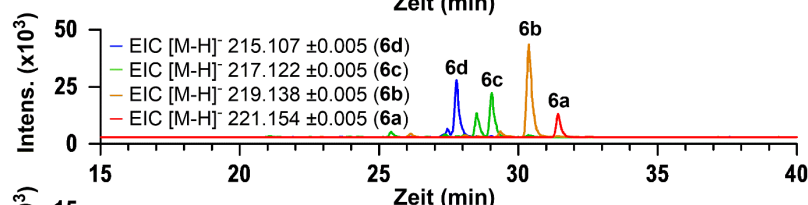
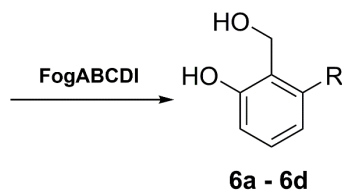
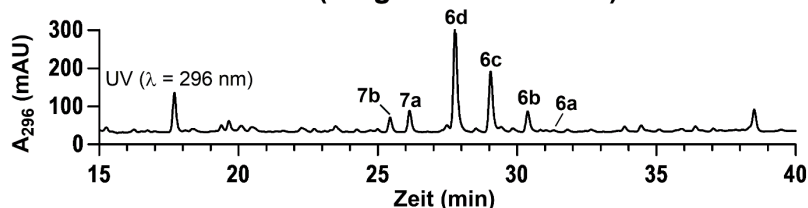
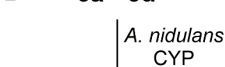
4.1.5.5 Heterologe Expression von *fogABCDI* ohne modifizierende Enzyme in *Aspergillus nidulans* LO8030

Zur Bestätigung der Hypothese, dass FogABCD für die Biosynthese des ersten aromatischen Intermediats verantwortlich sind, wurden *fogE* – *fogH* in *A. nidulans* JN004 aus dem Cluster entfernt. *fogE* kodiert für ein Cytochrom P450 Enzym, dessen Funktion als Monooxygenase für die Hydroxylierung an C3 des aromatischen Rings schon durch seine Deletion bestätigt wurde, während FogH als aromatische Prenyltransferase vermutlich die Prenylierung an C5 durchführt. Der FAD-abhängigen Oxidoreduktase FogF konnte noch keine begründete Funktion zugesprochen werden, jedoch kann angenommen werden, dass die Salicylalkohole **6a** – **6d** in einem späteren Schritt reoxidiert werden müssen, um als finale Salicylaldehyde zu enden.

Zunächst wurde ein Stamm konstruiert, in dem nur die Gene für eine wahrscheinliche Modifikation der aromatischen Intermediate deletiert sind. In dem Fall wurden *fogE*, *fogF* und *fogH* entfernt, so dass nur die hypothetischen „Kerngene“ *fogABCD* zusammen mit dem vermutlich funktionslosen *fogG* und dem Transkriptionsfaktor *fogl* exprimiert werden. Für die Erschaffung dieses Stamms wurde der *fog*-Cluster erneut aus einzelnen Fragmenten rekonstruiert. Zur Amplifikation der einzelnen Fragmente wurden die Primer prJN081 – prJN085, prJN090 und prJN250 – prJN253 benutzt. Die Fragmente wurden so amplifiziert, dass ihre Sequenz vor der ersten Base von *fogEF* bzw. *fogH* endete oder nach der letzten Base von *fogEF* bzw. *fogH* startete. Über diese Primer wurde ein 25 bp langer homologer Überhang zwischen den Fragmenten eingeführt. Wie für pJN014 wurde auch pYWB2 per PCR mit dem Primerpaar prJN080/091 linearisiert. Nach HR der Fragmente mit dem Vektor in *S. cerevisiae* entstand pJN041 (Abbildung 59A). Durch Restriktionsverdau mit KpnI und XbaI wurde pJN041 auf seine Korrektheit überprüft (Abbildung 59B; Erwartete Fragmente: 272, 779, 2194, 3356, 4147, 4849, 9085 bp). Nach Transformation von *A. nidulans* LO8030 mit dem Swal-linearisierten pJN041 entstand der *fogABCDGI*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN020. Durch seinen weißen Phänotyp (Abbildung 59D) und die positive PCR mit den Primern prJN064 und prJN082 (Abbildung 59C; Erwartetes Fragment: 1105 bp) wurde die korrekte Integration des modifizierten *fog*-Clusters in den *wA*-PKS-Lokus des *A. nidulans* Genoms (Abbildung 59E) bestätigt.

In diesem Stamm sollte auch *fogG* deletiert werden, um sicherzustellen, dass dieses wirklich nicht an der Biosynthese des ersten aromatischen Intermediats beteiligt ist. Da die Sequenzen der 5'- und 3'-flankierenden Bereiche von *fogG* im modifizierten Cluster von *A. nidulans* JN020 Änderungen gegenüber des nativen *fog*-Clusters aufweisen, mussten diese mit den angepassten Primerpaaren prJN140/273 bzw. prJN141/274 neu amplifiziert werden. Wie für die vorherigen Deletionsplasmide wurden diese Flanken mit *AfpYrG* und dem Rückgrat von pYWB2 via HR in *S. cerevisiae* zusammen kloniert. Das entstandene pJN051 (Abbildung 60A) wurde mittels BamHI-Verdau kontrolliert (Abbildung 60B; Erwartete Fragmente: 1798, 5751 bp). Durch Transformation von *A. nidulans* JN020 mit dem Swal-linearisierten pJN051 wurde der Δ *fogEFGH*-Stamm *A. nidulans* JN029 geschaffen (Abbildung 60D). Die Abwesenheit von *fogG* wurde über PCR mit prJN165/166 bestätigt (Erwartetes Fragment: keins; Positivkontrolle oder negativer Transformand: 1102 bp). Zur Kontrolle der korrekten Integration der Markerkassette wurden PCRs mit den Primerpaaren prJN147/167 (Erwartetes Fragment: 1804 bp) und prJN144/168 (Erwartetes Fragment: 1858 bp) durchgeführt (Abbildung 60C).



A. *A. nidulans* JN004 (fog-Cluster)**B. *A. nidulans* JN020 ($\Delta fogEFH$ in JN004)****C. *A. nidulans* JN029 ($\Delta fogEFGH$ in JN004)****D. 6a - 6d**

7a - 7d



1a - 1d

Abbildung 61: LC-MS-Analyse des Rohextrakts der $\Delta fogEFH$ - bzw. $\Delta fogEFGH$ -Mutanten *A. nidulans* JN020 und JN029
 Verglichen mit der Expression des kompletten Clusters (A) sind in den $\Delta fogEFH$ - (B) und $\Delta fogEFGH$ - (C) Stämmen keine Salicylaldehyde 1a – 1f zu finden. Wie bei der Deletion von *fogE* akkumulieren in beiden Stämmen die Salicylalkohole 6a – 6d, sowie zwei neue Intermediate: die hydroxylierten Salicylalkohole 7a und 7b werden nicht zu den Endprodukten umgesetzt, da die restlichen Enzyme des Pathways fehlen (D). Beide Stämme zeigen ein identisches Sekundärmetabolitprofil.

Die $\Delta fogEFH$ - und $\Delta fogEFGH$ -Stämme *A. nidulans* JN020 und JN029 wurden auf 25 g Reismedium bei 25°C inkubiert. Eine Probe nach 10 Tagen wurde mit Ethylacetat extrahiert und über LC-MS analysiert. Wie im $\Delta fogE$ -Stamm JN007 zuvor konnten sowohl in JN020 als auch in JN029 die Intermediate **6a** – **6d** detektiert werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus der Deletion der einzelnen Gene *fogA*, *fogB*, *fogC*, *fogD* und *fogG* kann darauf geschlossen werden, dass die Enzyme FogABCD dafür benötigt werden die ersten korrekt zyklisierten, aromatischen Intermediate (**6a** – **6d**) der Flavoglucinbiosynthese zu bilden. Das Polyketid wird von FogABCD nicht etwa als 2-Alkyl-Salicylsäure oder 2-Alkyl-Salicylaldehyd freigesetzt, sondern scheinbar in zwei Reduktionsschritten zu 2-Alkyl-Salicylalkohol reduziert.

Anstelle der in JN007 beobachteten Endprodukte wurden hier allerdings zwei neue Substanzen **7a** und **7b** sichtbar. Die Isolierung und Identifizierung dieser Substanzen wird im nächsten Kapitel über den $\Delta fogH$ -Stamm *A. nidulans* JN006 näher thematisiert. Bei diesen Substanzen handelte es sich um 3,6-Dihydroxy-2-Alkyl-Benzylalkohole, also die an C3 hydroxylierten Produkte aus **6a** und **6b**. Diese wurden höchstwahrscheinlich wie zuvor im $\Delta fogE$ -Stamm *A. nidulans* JN007 durch ein intrinsisches *A. nidulans*-Enzym hydroxyliert. Da aber in JN020 und JN029 die weiteren Enzyme des Pathways nicht produziert werden, wurden **7a** und **7b** nicht weiter zu den Clusterendprodukten **1a** und **1b** umgesetzt.

4.1.6 Prenylierung der 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkoholintermediate und ihre spontane Oxidation zu Chinonen

4.1.6.1 Deletion von *fogH* in *Aspergillus nidulans* JN004

Die aromatische Prenyltransferase FogH ist mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Prenylierung eines aromatischen Vorläufermoleküls an C5 verantwortlich. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das Gen *fogH* in *A. nidulans* JN004 deletiert, was zur Akkumulation eines unprenylierten Intermediats führen sollte. Das Plasmid zur Deletion wurde wie die anderen Deletionskonstrukte kloniert. Dazu wurden die 5'- und 3'-flankierenden Regionen von *fogH* mit den Primerpaaren prJN119/120 und prJN121/122 amplifiziert und mit dem PCR-linearisierten Rückgrat von pYWB2 und *AfpYrG* mittels HR in Hefe zu pJN019 kloniert (Abbildung 62A). pJN019 wurde durch einen Restriktionsverdau mit BamHI kontrolliert (Abbildung 62B; Erwartete Fragmente: 807, 1197, 5545 bp). Die *fogH*-Deletionsmutante *A. nidulans* JN006 entstand nach Transformation des Clusterexpressionsstamms JN004 mit *SwaI*-linearisiertem pJN019 (Abbildung 62D). Die Abwesenheit von *fogH* wurde durch PCR mit den Primern prJN145 und prJN146 bestätigt (Abbildung 62C; Erwartetes Fragment: keins, in Positivkontrolle: 1018 bp), während die korrekte Integration der Flanken mit den Primerpaaren prJN143/167 (Erwartetes Fragment: 1314 bp) und prJN144/168 (Erwartetes Fragment: 1257 bp) kontrolliert wurde.

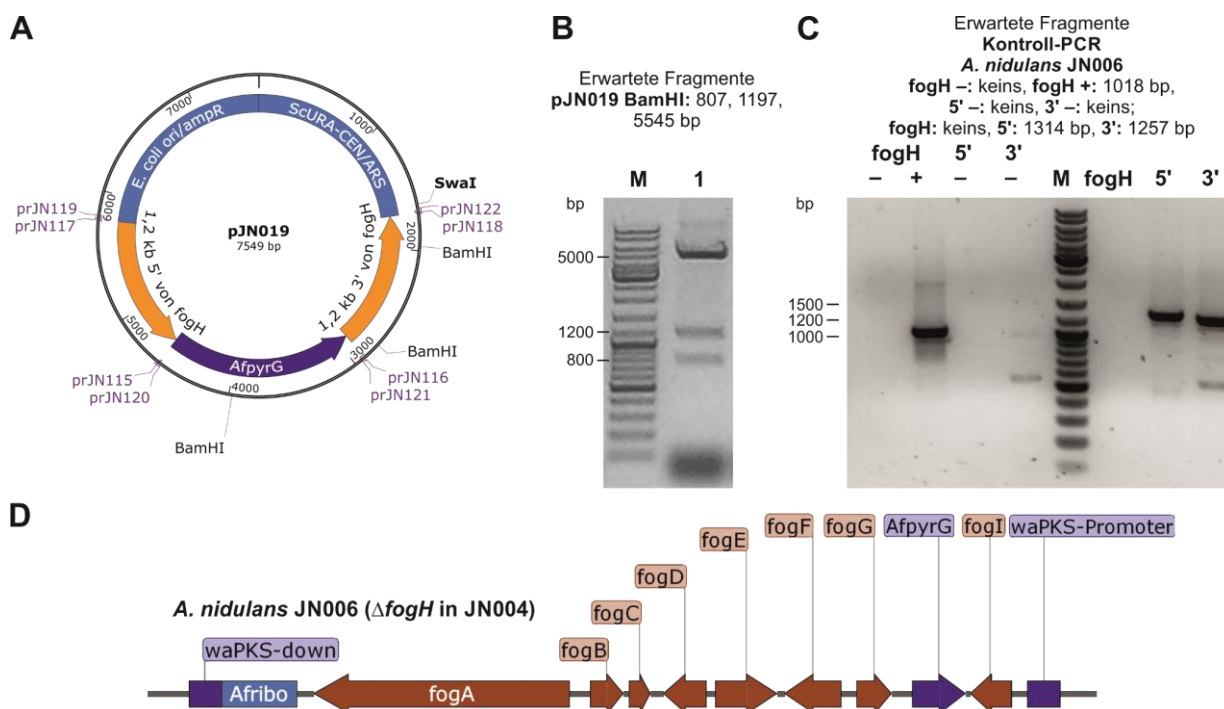
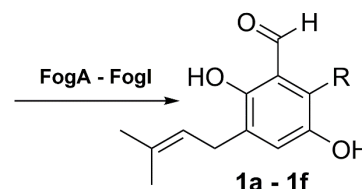
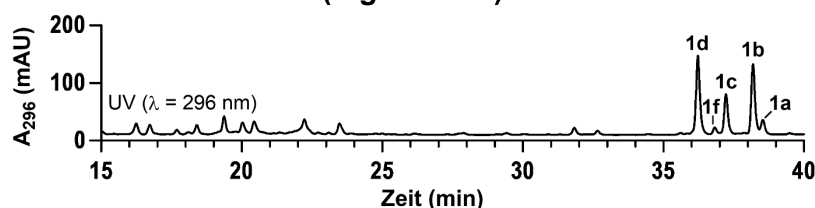


Abbildung 62: Kontrolle von pJN019 und dem $\Delta fogH$ -Stamm *A. nidulans* JN006

Plasmidkarte von pJN019 (A). Restriktionsverdau von pJN019 mit BamHI (Erwartete Fragmente: 807, 1197, 5545 bp) (B). Kontroll-PCR für *A. nidulans* JN006 (Erwartete Fragmente: *fogG*: keins, 5': 1314 bp, 3': 1257 bp) (C). Genotyp von *A. nidulans* JN006 (D).

Nach einer 10-tägigen Inkubation von *A. nidulans* JN006 auf 25 g Reismedium bei 25°C erfolgte die Extraktion einer Probe mit Ethylacetat und ihre Analyse *via* LC-MS. Dabei konnten im Gegensatz zu *A. nidulans* JN004 keine Clusterendprodukte **1a** – **1f** mehr nachgewiesen werden. Stattdessen akkumulierten die schon im *fogABCDI*-Expressionsstamm JN029 beobachteten Intermediate **7a** und **7b** (Abbildung 63B). Anhand der Massen von **7a** ($[M - H]^-$ m/z 237.1491; errechnet: $[M - H]^-$ m/z 237.1485) und **7b** ($[M - H]^-$ m/z 235.1332; errechnet: $[M - H]^-$ m/z 235.1329) konnten ihre Summenformeln $C_{14}H_{22}O_3$ und $C_{14}H_{20}O_3$ aufgestellt werden.

A *A. nidulans* JN004 (*fog*-Cluster)



B *A. nidulans* JN006 ($\Delta fogH$ in JN004)

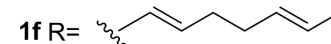
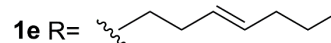
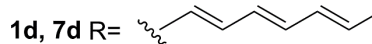
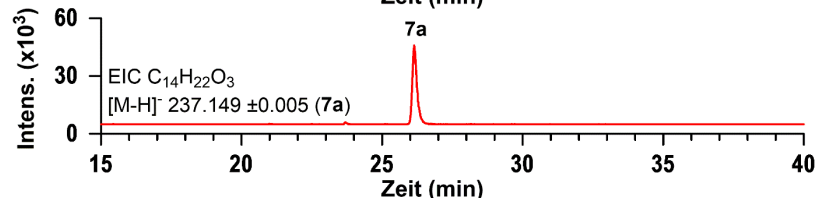
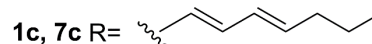
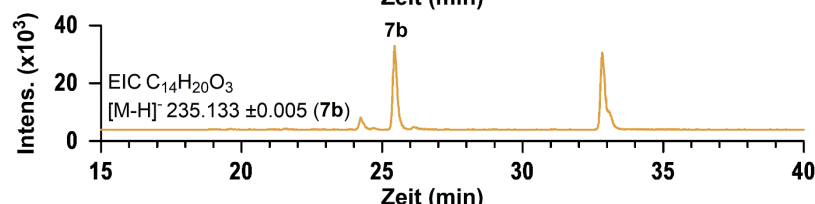
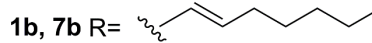
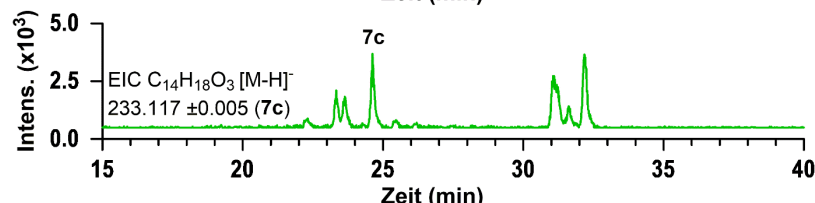
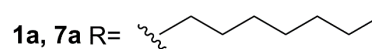
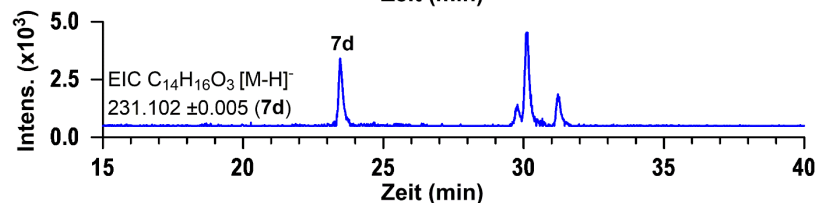
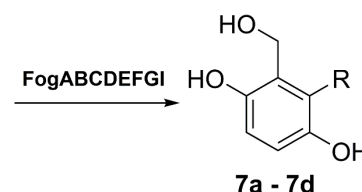
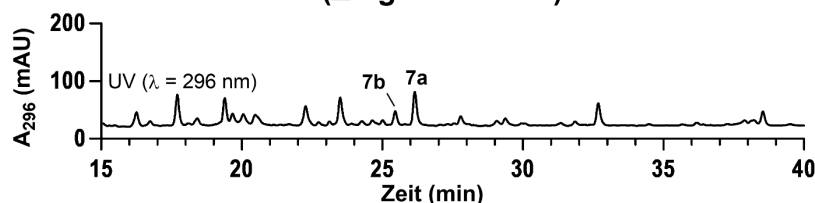


Abbildung 63: LC-MS-Analyse des Rohextrakts der $\Delta fogH$ -Mutante *A. nidulans* JN006

In der $\Delta fogH$ -Mutante *A. nidulans* JN006 konnten die Intermediate **7a** und **7b** beobachtet werden (B). Die Clusterendprodukte **1a** – **1f**, wie sie von JN004 produziert werden (A), waren hingegen nicht mehr zu erkennen. Spuren von **7c** mit zwei und **7d** mit drei Doppelbindungen in der Seitenkette konnten zwar in der Masse entdeckt werden, wurden aber nicht isoliert.

Die Kultivierung von *A. nidulans* JN006 zur Isolierung von **7a** und **7b** erfolgte auf 30x 250 g Reismedium in 2 L Fernbachkolben bei 25°C für 10 Tage. Wie die anderen Intermediate zuvor wurden diese auch von Frau Dr. Huomiao Ran isoliert.

Die Intermediate wurden von Fr. Dr. Ran als die 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkohole Violaceoid C (**7a**) und A (**7b**) identifiziert,⁴⁴¹ was darauf hindeutete, dass die durch FogE hydroxylierten Produkte die Substrate von FogH darstellen. Spuren der Derivate mit zwei (**7c**) oder drei (**7d**) Doppelbindungen konnten durch die EICs auch detektiert werden (Abbildung 63B), wurden aber nicht isoliert. Interessanterweise wurden in den EICs für die Massen von C₁₄H₁₆O₃, C₁₄H₁₈O₃ und C₁₄H₂₀O₃ weitere Signale bei einer Retentionszeit zwischen 30 und 35 min entdeckt. Diese Signale werden durch die Ergebnisse in den Kapiteln 4.1.6.2 und 4.1.7.1 näher erklärt.

4.1.6.2 FogH *in vitro*-Assays und Stabilität der 2-Heptyl-3,6-Dihydroxybenzylalkohol-Intermediate

FogH war schon zuvor Gegenstand einer Studie, die in unserem Labor von Frau Viola Wohlgemuth durchgeführt wurde.¹¹⁸ In dieser Studie wurde postuliert, dass FogH (in dieser Studie bezeichnet mit seiner Accession number EYE95342) an der Prenylierung von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie beteiligt ist, allerdings konnte mit diesen Substraten keine Aktivität nachgewiesen werden. Als Bestandteil des *fog*-Clusters ist es jedoch wahrscheinlicher, dass ein Intermediat der Flavoglaucinbiosynthese das eigentliche Substrat von FogH darstellt. Durch die Deletion von *fogH* und die Akkumulation der unprenylierten Intermediate **7a** und **7b** wurde diese Annahme bestärkt. Zur Bestätigung und genaueren Untersuchung seiner Funktion wurde FogH heterolog in *E. coli* überproduziert und in *in vitro*-Assays mit verschiedenen Substraten getestet.

Die heterologe Expression von *fogH* erfolgte nicht exakt wie zuvor beschrieben,¹¹⁸ sondern wurde modifiziert. Kompetente *E. coli* XL1-Blue wurden mit dem Plasmid pVW84 transformiert. Eine Über-Nacht-Vorkultur des transformierten Stamms wurde dazu benutzt 20 x 100 ml LB in 250 ml Erlenmeyerkolben auf eine OD₆₀₀ von 0,6 zu inokulieren. Diese Kulturen wurden bei 30°C, schüttelnd mit 230 rpm für 16,5 h inkubiert. Eine Induktion mit IPTG erfolgte nicht, da die Basalexpression des T5-Promotors unter Kontrolle zweier *lac*-Operatoren (pVW84 basiert auf dem kommerziellen Plasmid pQE-70) ausreicht das lösliche Protein zu produzieren. Dadurch wird in diesem speziellen Fall eine Präzipitation durch übermäßige Expression vermieden. Das rekombinante Protein enthielt einen C-terminalen Hexahistidin-Tag und wurde über Affinitätschromatographie mit NiNTA-Agarose aufgereinigt. Zur Abtrennung von letzten Hintergrundproteinen und zum Pufferaustausch wurde das rekombinante FogH einer Gelfiltration unterzogen. Das isolierte Protein wurde über SDS-PAGE analysiert (M_w FogH-6xHis: 50,9 kDa) (Abbildung 64A).

Die *in vitro*-Assays zur Bestimmung der FogH-Aktivität (50 µl) enthielten 10 mM CaCl₂, 2 mM DMAPP, 0,5 – 5 % Glycerin, bis zu 5 % DMSO, 0,1 mM des jeweiligen Substrats und 0,1 µM gereinigte rekombinante FogH. Die Reaktionen wurden für 10 min bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 50 µl Acetonitril terminiert. Nach Zentrifugation wurden die Assays über HPLC analysiert. In dem 10-minütigen Assay wurden 77,7 % des unprenylierten 2-Heptyl-3,6-Dihydroxybenzylalkohols Violaceoid C

(**7a**) zu **9a** konvertiert (Abbildung 64B). Die Strukturaufklärung, durchgeführt von Frau Dr. Huomiao Ran, identifizierte **9a** wie erwartet als das an C5 prenylierte Produkt von **7a**. Während der Isolierung beider Produkte aus einem auf 10 ml hochskalierten Assay wurde bemerkt, dass **9a** spontan zu seinem Chinon **10a** oxidieren kann, welches in dem FogH Assay mit einer Ausbeute von 2,3 % ebenfalls entdeckt werden konnte.

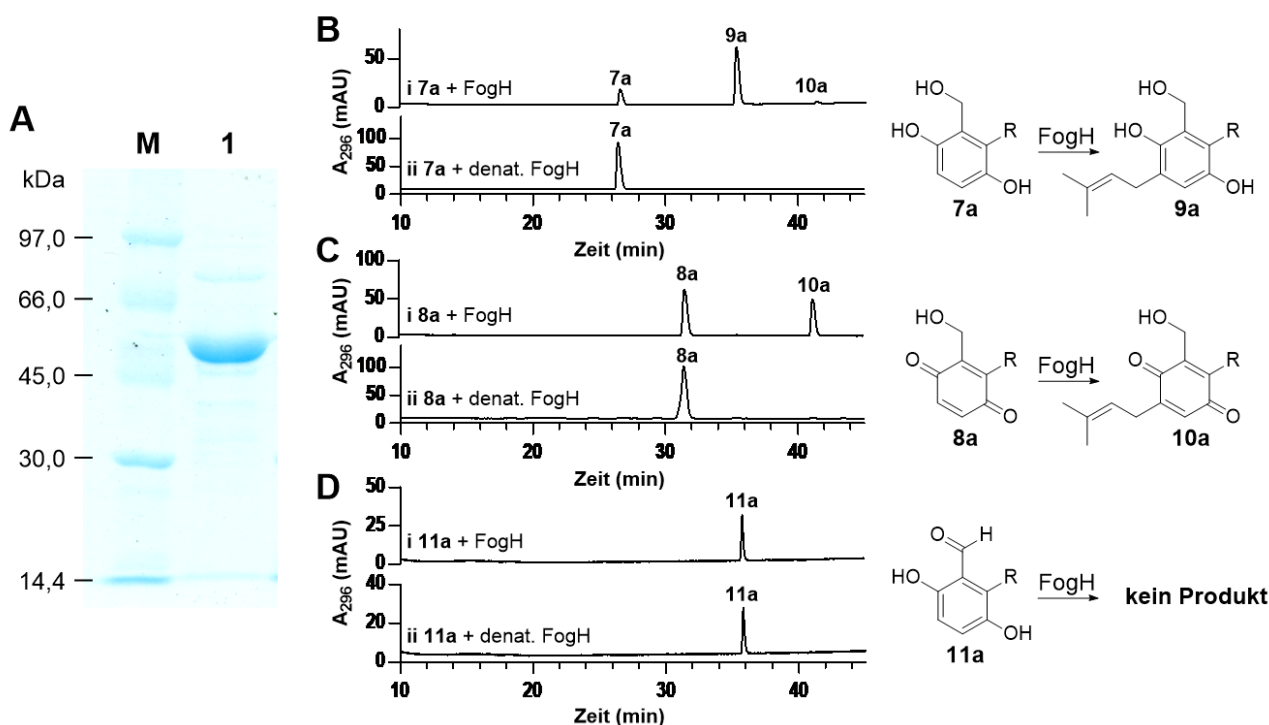


Abbildung 64: SDS-PAGE des rekombinanten FogH-6xHis und *in vitro*-Assays von FogH mit 7a, 8a oder 11a

Als Größenstandard (Spur M) für die SDS-PAGE (A) wurde das Amersham LMW Calibration Kit (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) benutzt. Die Masse des isolierten Proteins (Spur 1) stimmte ungefähr mit der errechneten Masse von FogH-6xHis (50,9 kDa) überein. FogH prenyliert sowohl das Hydrochinon **7a** (B), als auch sein Chinon **8a** (C). Das Salicylaldehyd **11a** wird nicht durch FogH akzeptiert (D), was die Wichtigkeit der reduktiven Freisetzung des ersten aromatischen Intermediats als Alkohol unterstreicht.

Durch Inkubation in wässriger Lösung bei 25°C für 4 h konnte eine spontane Konversion zwischen dem Hydrochinon **7a**, seinem Benzochinon **8a** und dem Salicylaldehyd **11a**, sowie zwischen ihren prenylierten Pendants **9a**, **10a** und dem Clusterendprodukt **1a** nachgewiesen werden. Oxidation von **7a** zu **8a** konnte bereits nach 30 min beobachtet werden (Abbildung 65A). Interessanterweise reduzierte **8a** im Gegenzug wieder spontan zu **7a** oder oxidierte weiter zum Salicylaldehyd **11a** (Abbildung 65B). Das Verhältnis zwischen dem Reduktionsprodukt **7a** und dem Oxidationsprodukt **11a** betrug ungefähr 1:1. Die prenylierten Substanzen **9a** und **10a** verhielten sich ähnlich. Das Hydrochinon **9a** oxidierte spontan zum Chinon **10a** (Abbildung 65C), während **10a** in wässriger Lösung sowohl spontan zu **9a** reduzierte als auch zum Aldehyd **1a** oxidierte (Abbildung 65D).

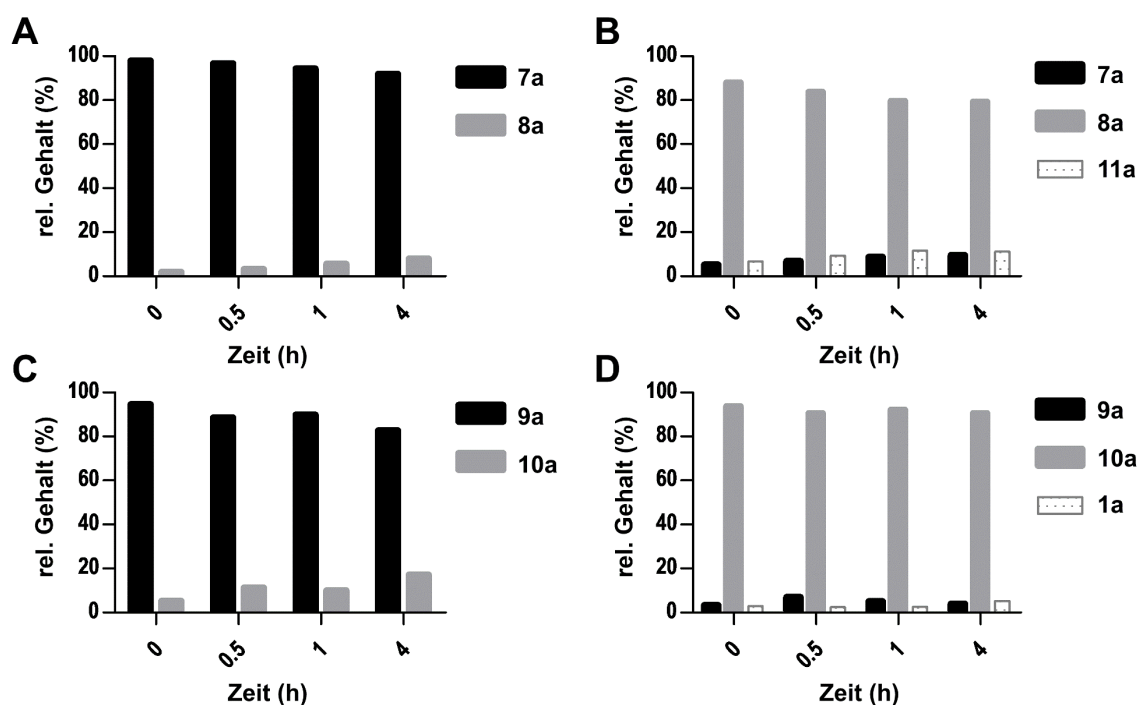


Abbildung 65: Konversion zwischen 7a, 8a und 11a bzw. 9a, 10a und 1a

In wässriger Lösung oxidierte **7a** einfach zu **8a** (A), **8a** jedoch konnte spontan sowohl zu **7a** reduzieren als auch weiter zu **11a** oxidieren (B). Genauso verhalten sich ihre prenylierten Pendanten: **9a** oxidiert spontan zum Chinon-Alkohol **10a**, **10a** hingegen kann wieder spontan zum Hydrochinon-Alkohol **9a** reduzieren (C) während eine vergleichbare Menge des Salicylaldehyds **1a** gebildet wird (D). Die Stabilitätstests wurden nur in Doppelbestimmung durchgeführt, deswegen sind keine Fehlerbalken verzeichnet.

Das Chinon **8a** wurde ebenfalls in einem *in vitro*-Assay mit FogH getestet (Abbildung 64C). Dieses wurde zu 41,0 % zu **10a** umgesetzt. Das von Frau Dr. Huomiao Ran synthetisierte Hydrochinon-Aldehyd **11a** jedoch wurde von FogH nicht konsumiert, was darauf hinweist, dass die Benzylalkoholfunktion eine Voraussetzung für die Prenylierung durch FogH ist. Durch diese Ergebnisse erscheint es sinnvoll, dass das Polyketid als Benzylalkohol von FogABCD freigesetzt und nicht nur in einer 2e⁻-Reduktion als Aldehyd abgespalten wird, obwohl die prenylierten Benzylalkohole final wieder zu Aldehyden reoxidiert werden müssen.

Die Kinetiken für den Umsatz von **7a** und **8a** mit FogH wurden von Fr. Dr. Ran bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der Umsatz beider Substrate einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt (Abbildung 66). Der K_M für **7a** betrug $0,07 \pm 0,01$ mM mit einem K_{cat} von $2,02 \pm 0,08$ s⁻¹. Für **8a** war der K_M mit $0,09 \pm 0,01$ mM leicht höher, dafür betrug der K_{cat} nur $1,15 \pm 0,04$ s⁻¹. Bei einer katalytischen Effizienz von $28,86$ s⁻¹ mmol⁻¹ L mit **7a** gegenüber $12,78$ s⁻¹ mmol⁻¹ L mit **8a** setzt FogH die Hydrochinonform wesentlich effizienter um. Diese Annahme wird auch dadurch bestärkt, dass **7a** und **7b** die hauptsächlich akkumulierten Intermediate im $\Delta fogH$ -Stamm *A. nidulans* JN006 sind.

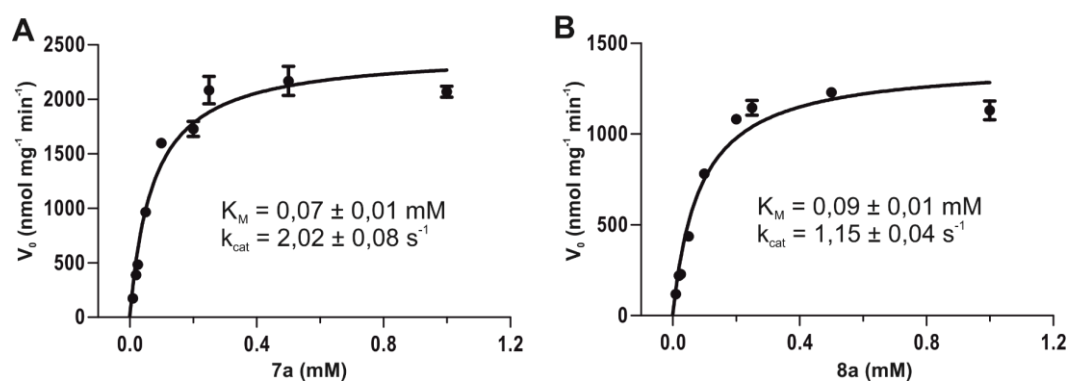


Abbildung 66: Michaelis-Menten-Kinetik von FogH mit den Substraten 7a und 8a

Der Umsatz von **7a** (A) und **8a** (B) durch FogH folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik. **7a** scheint aufgrund der leicht erhöhten Affinität zu FogH und des effizienteren Umsatzes das bessere Substrat zu sein.

4.1.7 Reoxidation der prenylierten Salicylalkoholintermediate zum finalen Aldehyd

4.1.7.1 Deletion von *fogF* in *Aspergillus nidulans* JN004

Die Produkte der Prenyltransferase FogH **9a** – **9d** unterscheiden sich nur durch die Oxidationsstufe der Hydroxymethylgruppe von den finalen Clusterendprodukten **1a** – **1d**. Im vorherigen Kapitel wurde zwar nachgewiesen, dass die prenylierten Hydrochinon-Benzylalkohole über ihre Chinonform auch spontan zu den finalen Aldehyden oxidiert werden, allerdings nur in einer geringen Rate. Sowohl im Ursprungsorganismus *A. ruber* QEN-0407-G2 als auch im heterologen Expressionstamm *A. nidulans* JN004 konnten ausschließlich nur die Aldehyde detektiert werden. Das deutet darauf hin, dass die vollständige Reoxidation der Salicylalkohol-Intermediate zu den Salicylaldehyd-Endprodukten enzymatisch katalysiert wird. Ein Abgleich der Sequenz von FogF mit der NCBI *conserved domain database* zeigte, dass dieses die Möglichkeit besitzt FAD zu binden und somit potenziell eine Oxidoreduktasefunktion übernehmen kann. Zur Untersuchung seiner Funktion wurde das Gen *fogF* in *A. nidulans* JN004 deletiert.

Das Plasmid zur Deletion von *fogF* wurde analog zu den bisherigen Deletionskonstrukten kloniert. Zur Amplifikation der 5'- und 3'-Flanken von *fogF* dienten die Primerpaare prJN135/136 und prJN137/138. Zusammen mit *AfpYrG* und dem Rückgrat von pYWB2 wurden die Fragmente durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* zum Vektor pJN023 kloniert (Abbildung 67A). Durch einen Restriktionsverdau mit EcoRI und HindIII wurde pJN023 auf seine Korrektheit überprüft (Abbildung 67B; Erwartete Fragmente: 133, 216, 498, 1381, 5321 bp). Nach Transformation von *A. nidulans* JN004 Protoplasten mit Swal-linearisiertem pJN023 entstand der $\Delta fogF$ -Stamm *A. nidulans* JN010 (Abbildung 67D). Das Fehlen von *fogF* wurde über PCR mit den Primern prJN161 und prJN162 kontrolliert (Abbildung 67C; Erwartetes Fragment: keins, Positivkontrolle: 1026 bp). Die Integrität der umgebenden Flanken wurde durch PCR mit den Primern prJN159/167 (Erwartetes Fragment: 1299 bp) und prJN160/168 (Erwartetes Fragment: 1246 bp) bestätigt.

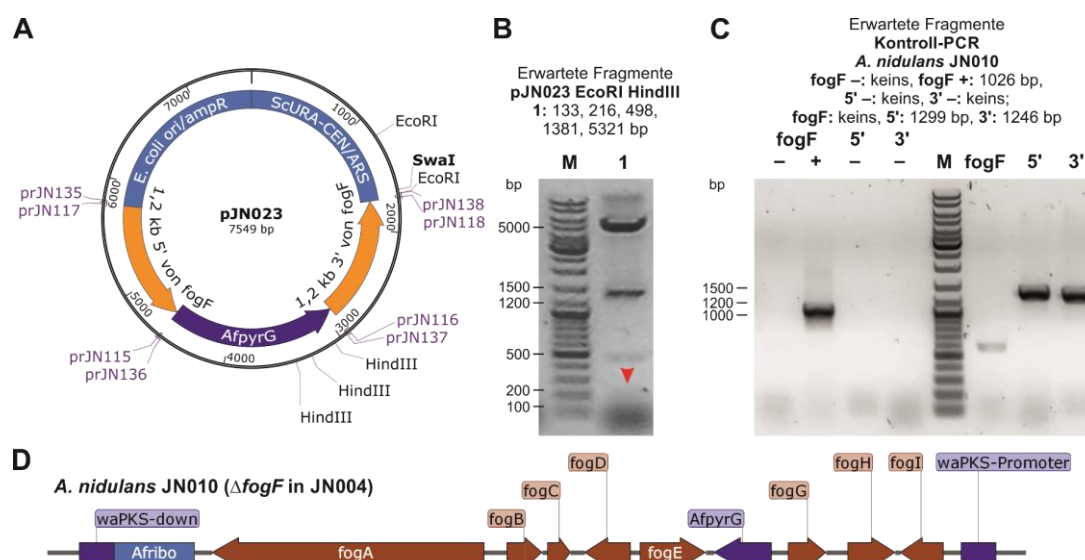


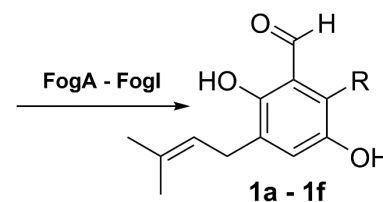
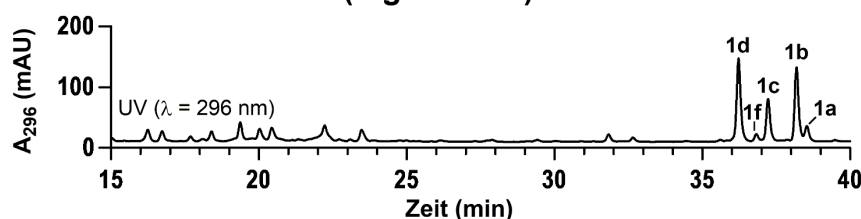
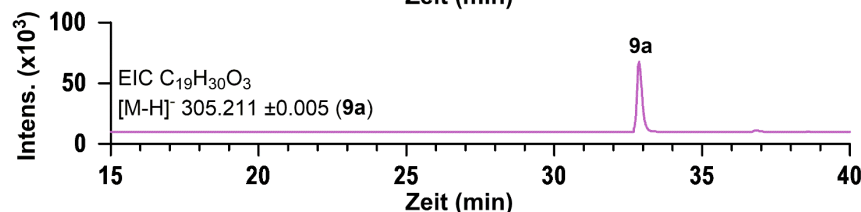
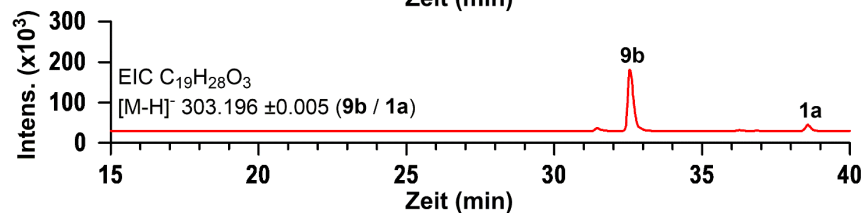
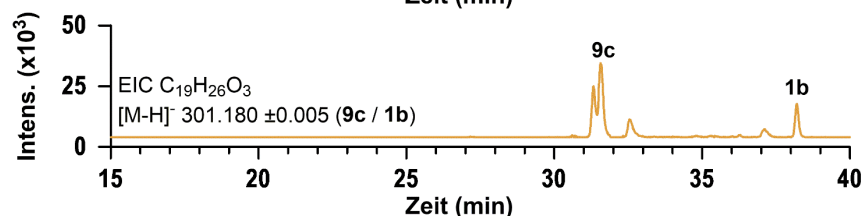
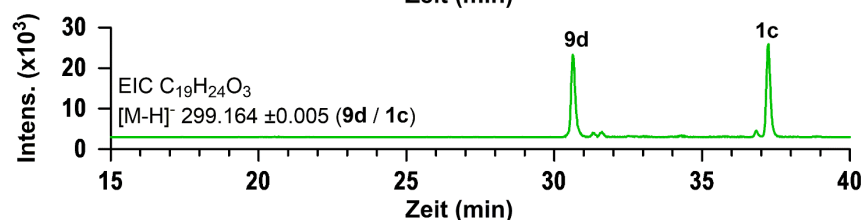
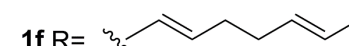
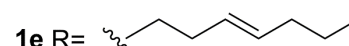
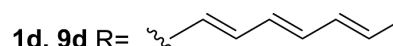
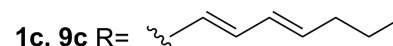
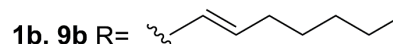
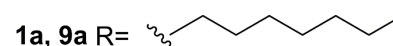
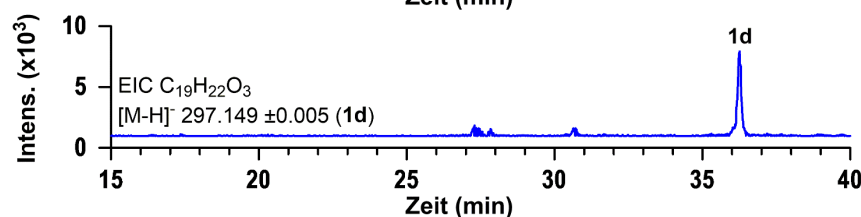
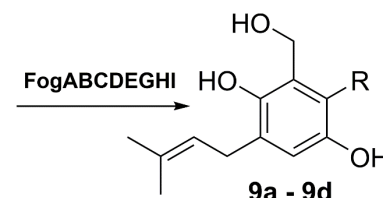
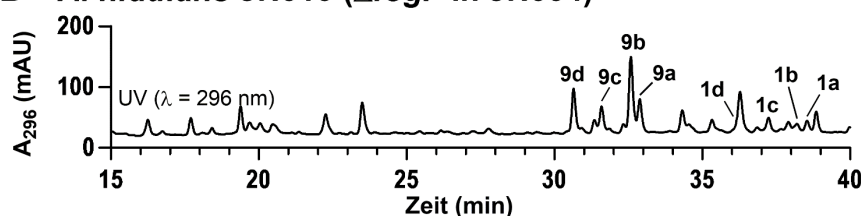
Abbildung 67: Kontrolle von pJN023 und dem $\Delta fogF$ -Stamm *A. nidulans* JN010

Plasmidkarte von pJN023 (**A**). Restriktionsverdau von pJN023 mit EcoRI und HindIII (Erwartete Fragmente 133, 216, 498, 1381, 5321 bp) (**B**). Kontroll-PCR für den $\Delta fogF$ -Stamm *A. nidulans* JN010 (Erwartete Fragmente: fogF: keins, 5': 1299 bp, 3': 1246 bp) (**C**). Genotyp von *A. nidulans* JN010 (**D**).

A. nidulans JN010 wurde auf 25 g Reismedium bei 25°C kultiviert. Eine Probe nach 10 Tagen wurde mit Ethylacetat extrahiert und der Extrakt wurde über LC-MS analysiert. Verglichen mit dem *fog*-Cluster Expressionsstamm JN004 (Abbildung 68A) konnten nach Deletion von *fogF* noch immer moderate Mengen der Clusterendprodukte **1a** – **1d** festgestellt werden, aber zusätzlich akkumulierten die Intermediate **9a** – **9d** (Abbildung 68B). **9a** war schon als Produkt von FogH bekannt und anhand der Massen von **9b** ($[M - H]^-$ m/z 303.1983; errechnet: $C_{19}H_{28}O_3$ $[M - H]^-$ m/z 303.1955), **9c** ($[M - H]^-$ m/z 301.1815; errechnet: $C_{19}H_{26}O_3$ $[M - H]^-$ m/z 301.1798) und **9d** ($[M - H]^-$ m/z 299.1657; errechnet: $C_{19}H_{24}O_3$ $[M - H]^-$ m/z 299.1642) ließ sich darauf schließen, dass diese sich durch die Anzahl ihrer Doppelbindungen in der C7-Seitenkette von **9a** unterschieden.

Zur Isolierung der Intermediate wurde *A. nidulans* JN010 auf 10 x 250 g Reismedium in 2 L Fernbachkolben bei 25°C für 10 Tage inkubiert. Die Isolierung und Strukturaufklärung wurde von Frau Dr. Huomiao Ran durchgeführt. Schon bei der Isolierung konnte beobachtet werden, dass **9a** teilweise zu seinem Chinon **10a** oxidiert, während **9b** zu dem neuen Produkt **12b** konvertierte. Nach spontaner Oxidation von **9b** über sein Chinon **10b** kommt es höchstwahrscheinlich zu einer intramolekularen Zyklisierung zwischen dem C3-Sauerstoff und C2' was zur Bildung von **12b** mit seinem Benzofuran-kern führt (Abbildung 69).

Dieses Phänomen könnte auch die zusätzlichen Signale bei einer Retentionszeit zwischen 30 und 35 min in den EICs für die Massen von **7b** – **7d** in den $\Delta fogEFH$ - (JN020), $\Delta fogEFGH$ - (JN029) und $\Delta fogH$ -Stämmen (JN006) erklären (Abbildung 61 und Abbildung 63). Die dazugehörigen Substanzen wurden nicht isoliert, da sie nur als Spur in der Masse erkennbar waren, aber bei ihnen handelt es sich höchstwahrscheinlich um Derivate von **7b** – **7d** mit einem Benzofuran-kern **13b** – **13d** (Abbildung 69).

A. *A. nidulans* JN004 (fog-Cluster)**B. *A. nidulans* JN010 ($\Delta fogF$ in JN004)****Abbildung 68: LC-MS-Analyse des Rohextrakts der $\Delta fogF$ -Mutante *A. nidulans* JN010**

Wie im Clusterexpressionsstamm JN004 (A) konnten auch im Extrakt der $\Delta fogF$ -Mutante *A. nidulans* JN010 (B) die Clusterendprodukte **1a – 1d** entdeckt werden, allerdings in signifikant geringerer Menge. Stattdessen akkumulierten hier die Intermediate **9a – 9d**, die sich nur durch die Oxidationsstufe der Hydroxymethylgruppe von Flavoglaucin und seinen Analoga unterschieden.

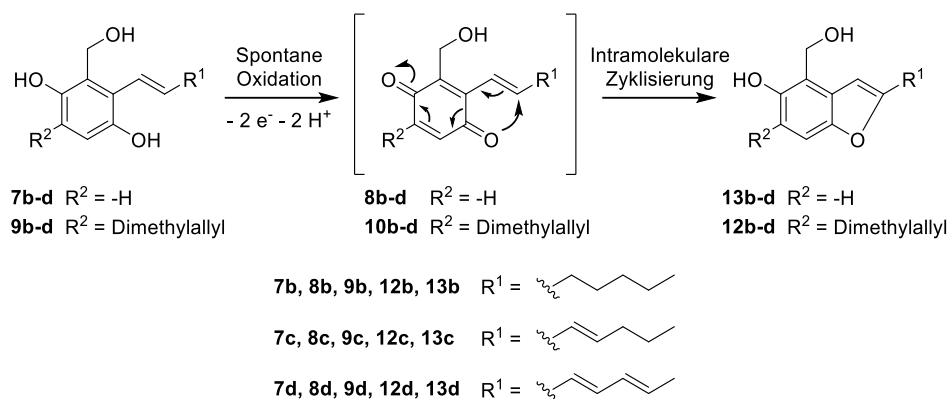


Abbildung 69: Spontane Bildung eines Benzofurankerns durch intramolekulare Zyklisierung

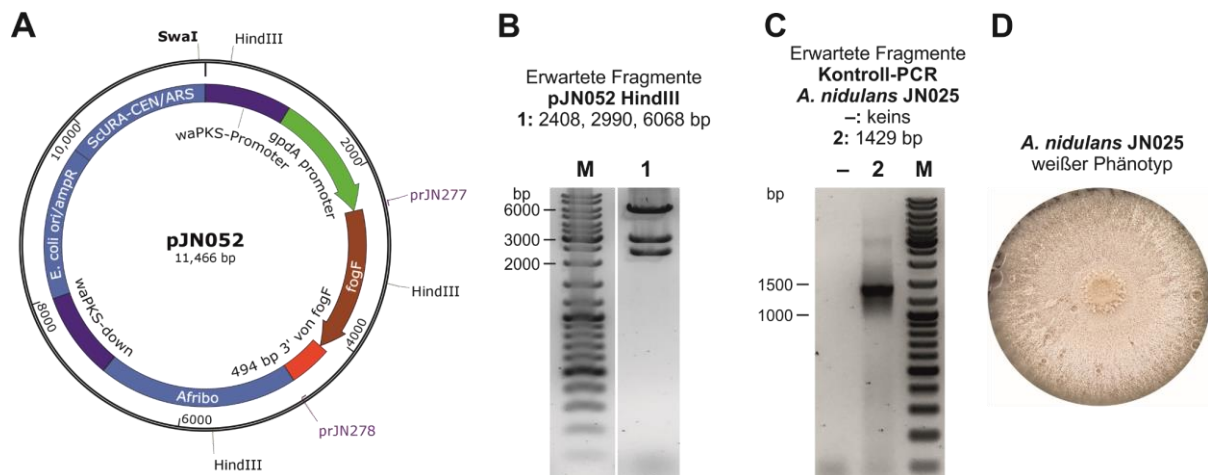
4.1.7.2 Fütterungsexperimente mit dem heterologen *fogF*-Expressionsstamm *Aspergillus nidulans* JN025

Die Akkumulierung der 2-Alkyl-3,6-Dihydroxy-5-(3''-Methylbut-2''-enyl)-Benzylalkohole **9a** – **9d** ist ein Hinweis darauf, dass FogF die finale Oxidation der Hydroxymethylgruppe zu einem Aldehyd katalysiert. Zur weiteren Überprüfung dieser Hypothese wurde versucht, FogF heterolog in *E. coli* zu produzieren und seine Funktion in *in vitro*-Assays zu bestätigen. Dazu wurde *fogF* von cDNA amplifiziert und über HR in *E. coli* in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. So entstanden die Vektoren pJN040, pJN042 und pJN044 (Tabelle 8). Diese Konstrukte unterschieden sich in der Nutzung des T5- oder T7-Promotorsystems und der Position des Hexahistidintags für die Aufreinigung des Proteins über Affinitätschromatographie. Die Expression von *fogF* mit diesen Konstrukten wurde in verschiedenen *E. coli*-Stämmen bei verschiedenen Temperaturen durch Induktion mit unterschiedlichen Mengen IPTG (bei OD₆₀₀ 0,5) getestet (Tabelle 59). Unter keiner der getesteten Bedingungen konnte funktionelles FogF gewonnen werden (Daten nicht gezeigt).

Alternativ zur Produktion des Proteins in *E. coli* wurde ein *A. nidulans* Stamm geschaffen, der *fogF* unter der Kontrolle des starken, konstitutiven *gpdA*-Promotors exprimiert. Zunächst wurde *fogF* zusammen mit 494 bp stromabwärts des Stopcodons als natürlicher Terminator mit den Primern prJN277 und prJN278 amplifiziert. Über HR in *E. coli* wurde dieses Fragment mit dem SfoI-linearisierten pJN017 zum *fogF*-Expressionsplasmid pJN052 kloniert (Abbildung 70A). pJN052 wurde durch Verdau mit HindIII auf seine Korrektheit überprüft (Abbildung 70B; Erwartete Fragmente: 2408, 2990, 6068 bp). Durch Transformation von *A. nidulans* LO8030 Protoplasten mit dem SmaI-linearisierten pJN052 entstand der *fogF*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN025. Durch eine Kontroll-PCR mit dem Primerpaar prJN200/201 wurde die Anwesenheit von *fogF* in dem Stamm bestätigt (Abbildung 70C; Erwartetes Fragment: 1429 bp). Der weiße Phänotyp der Transformanten zeigt die korrekte Integration in den wA-PKS-Lokus (Abbildung 70D).

Tabelle 59: Bedingungen für die Testexpression von *fogF* in *E. coli*

Vektor	Bedingung	Funktionelle Produktion von FogF in <i>E. coli</i> -Stamm?			
		BL21(DE3)	Rosetta (DE3) pLysS	M15	XL1-Blue
pJN040	37°C; 0,1 mM IPTG; 24 h	nein	nein	n.d.	n.d.
	37°C; 0,5 mM IPTG; 24 h	nein	nein	n.d.	n.d.
	37°C; 1 mM IPTG; 24 h	nein	nein	n.d.	n.d.
	30°C; 0,1 mM IPTG; 24 h	nein	nein	n.d.	n.d.
	30°C; 0,5 mM IPTG; 24 h	nein	nein	n.d.	n.d.
	30°C; 1 mM IPTG; 24 h	nein	nein	n.d.	n.d.
	20°C; 0,1 mM IPTG; 16 h	nein	nein	n.d.	n.d.
	20°C; 0,5 mM IPTG; 16 h	nein	nein	n.d.	n.d.
	20°C; 1 mM IPTG; 16 h	nein	nein	n.d.	n.d.
	20°C; 1 mM IPTG; 16 h	nein	nein	n.d.	n.d.
pJN042	37°C; 0,1 mM IPTG; 24 h	nein	nein	nein	nein
	37°C; 0,5 mM IPTG; 24 h	nein	nein	nein	nein
	37°C; 1 mM IPTG; 24 h	nein	nein	nein	nein
	30°C; 0,1 mM IPTG; 24 h	nein	nein	nein	nein
	30°C; 0,5 mM IPTG; 24 h	nein	nein	nein	nein
	30°C; 1 mM IPTG; 24 h	nein	nein	nein	nein
	20°C; 0,1 mM IPTG; 16 h	nein	nein	nein	nein
	20°C; 0,5 mM IPTG; 16 h	nein	nein	nein	nein
	20°C; 1 mM IPTG; 16 h	nein	nein	nein	nein
	20°C; 1 mM IPTG; 16 h	nein	nein	nein	nein
pJN044	37°C; 0,5 mM IPTG; 16 h	nein	nein	n.d.	n.d.
	30°C; 0,5 mM IPTG; 16 h	nein	nein	n.d.	n.d.
	16°C; 0,5 mM IPTG; 16 h	nein	nein	n.d.	n.d.

Abbildung 70: Kontrolle von pJN052 und dem *fogF*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN025

Plasmidkarte von pJN052 (A). Restriktionsverdau von pJN052 mit HindIII zur Kontrolle (Erwartete Fragmente: 2408, 2990, 6068 bp) (B). Kontroll-PCR zur Bestätigung der Anwesenheit von *fogF* (Erwartetes Fragment: 1429 bp) (C). Weißer Phänotyp des Stamms *A. nidulans* JN025 (D).

Diesem *fogF*-Expressionsstamm wurden potenzielle Substrate zugefüttert, um zu überprüfen, ob diese durch FogF umgesetzt werden. *A. nidulans* JN025 wurde in 5 ml PDB bei 25°C inkubiert. Nach Inokulierung der Kultur mit ca. 4×10^5 Sporen wurden 50 µM des zu testenden Substrats zugegeben. Nach 4 Tagen wurde die komplette Kultur mit Ethylacetat extrahiert und der Extrakt wurde über HPLC bzw. LC-MS analysiert. Neben dem Umsatz im *fogF*-Expressionsstamm JN025 wurde auch die Stabilität des Substrats in PDB und in Anwesenheit des Negativkontrollstamms JN002 analysiert.

In PDB ohne Anwesenheit eines Pilzes wurde **9a** in diesen 4 Tagen zu 66,5 % zu **10a** oxidiert, welches zu 15,5 % weiter zu **1a** umgewandelt wurde (Abbildung 71Aiii). Im Medium schien hauptsächlich das Chinon vorzuliegen. In Anwesenheit des *fogF*-Expressionsstamms wurden 95,0 % von **9a** zum Endprodukt **1a** konvertiert (Abbildung 71Ai). Im Vergleich dazu konnte in der Negativkontrolle nur ein 2,8 %iger Umsatz zu **1a** beobachtet werden (Abbildung 71Aii). In dieser Kultur war **9a** noch immer die dominante Substanz (77,0 %), nur 20,0 % wurden zum Chinon **10a** oxidiert. Scheinbar schafft die Anwesenheit des Pilzes Bedingungen, in denen bevorzugt die reduzierte Hydrochinonform vorliegt. Das wird nicht nur durch die detektierten Produkte **9a** – **9d** in der $\Delta fogF$ -Mutante JN010 bestätigt (Abbildung 68), sondern auch durch Fütterungsexperimente mit dem Chinon **10a**. Wie Abbildung 71Bi zu entnehmen ist, wurden 98,7 % des zugefütterten **10a** in Anwesenheit von *A. nidulans* JN025 zu **1a** umgesetzt, während in dem Experiment mit dem Negativkontrollstamm JN002 nur 1,4 % **1a** zu beobachten waren (Abbildung 71Bii). Dafür wurde **10a** dort zu 87,0 % wieder zu seinem Hydrochinon **9a** reduziert. Es ist denkbar, dass das zugefütterte **10a** durch die Umgebungsbedingungen zu **9a** reduzierte, was anschließend von FogF zu **1a** oxidiert wurde. Des Weiteren trägt die spontane Konversion von Chinonmolekülen zu den Hydrochinonformen des Benzylalcohols bzw. -aldehyds auch zur Anwesenheit von **9a**, **10a** und **1a** in den Negativ- bzw. Mediumkontrollen bei. Diese Ergebnisse zeigen, dass FogF in der Tat für die Reoxidation der durch FogE und FogH modifizierten Salicylalkohole zu den finalen Salicylaldehydprodukten zuständig ist.

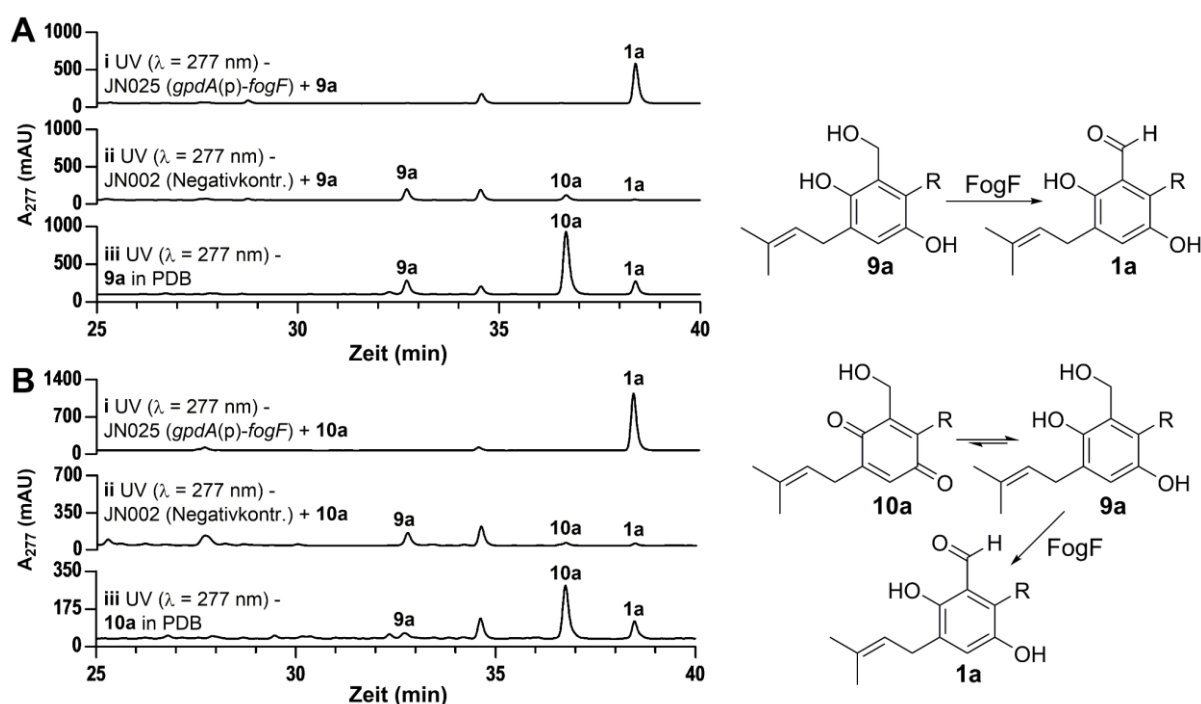


Abbildung 71: Fütterung von **9a und **10a** zum *fogF*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN025**

Nach Zufütterung von **9a** zu dem *fogF*-Expressionsstamm JN025 (A) wurden über 95 % zum finalen Produkt **1a** oxidiert. Im Medium oxidierte der Großteil zum Chinon **10a** und nur in geringer Menge weiter zu **1a**. In Anwesenheit der Negativkontrolle blieb das Hydrochinon **9a** stabil. Nach Zugabe von **10a** (B) konnte ähnliches beobachtet werden. Vermutlich wurde **10a** in Anwesenheit des Pilzes zu **9a** reduziert, was dann von FogF weiter zu **1a** oxidiert wurde.

Außer dem prenylierten Intermediat **9a** und seinem Chinon **10a** wurde auch das unprenylierte **7a** als mögliches Substrat für FogF zugefüttert. In Abwesenheit des Pilzes im Medium oxidierte **7a** wie erwartet größtenteils zu seinem Chinon **8a** (75,4 %) und in geringem Maße weiter zu dem Aldehyd **11a** (13,2 %) (Abbildung 72Aiii). Verglichen mit der Negativkontrolle (Abbildung 72Aii) war im Extrakt des *fogF*-Expressionsstamms JN025 keine signifikante Bildung des Aldehyds **11a** zu erkennen (Abbildung 72Ai). Wie schon bei seinem prenylierten Pendant beobachtet werden konnte, blieb das Hydrochinon **7a** in Anwesenheit des Negativkontrollstamms JN002 sowie des *fogF*-Expressionstamms JN025 überwiegend stabil (ca. 90 %) und konvertierte nur wenig zu **8a** (ca. 9 %) bzw. **11a** (ca. 1 %). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Prenylgruppe für die Oxidation zum Salicylaldehyd essenziell ist und diese Reaktion den letzten Schritt der Flavoglaucinbiosynthese darstellt. Das stimmt damit überein, dass nach Deletion des Prenyltransferasegens *fogH* keine unprenylierten Aldehyde entdeckt werden konnten (Abbildung 63).

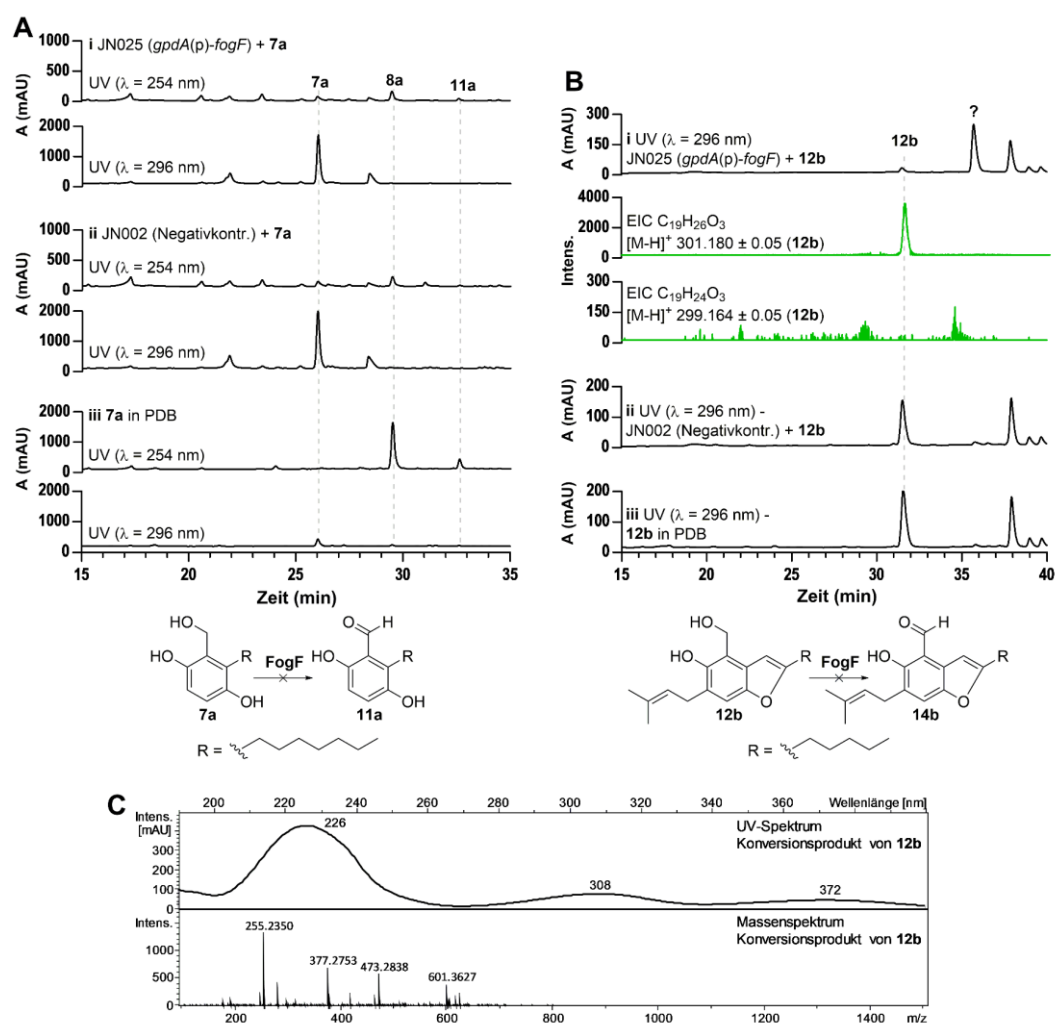


Abbildung 72: Fütterung von **7a und **12b** zum *fogF*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN025**

Die Wichtigkeit der Prenylgruppe für die Oxidation durch FogF wurde dadurch unterstrichen, dass nach Zufüttern von **7a** zum *fogF*-Expresionstamm JN025 kein signifikanter Umsatz zu seinem Aldehyd **11a** stattfand (A). Das Hydrochinon **7a** und sein Chinon **8a** verhielten sich identisch zu ihren prenylierten Pendanten im Hinblick auf ihre spontane Konversion. Die Benzofuranverbindung **12b** wurde von FogF nicht zum erwarteten Aldehyd **14b** umgesetzt, stattdessen wurde ein anderes Produkt gebildet, das noch nicht näher identifiziert wurde (B). UV- und Massenspektrum des unidentifizierten Produkts (C).

Als weiteres potenzielles Substrat für FogF wurde *A. nidulans* JN025 eine Verbindung mit Benzofuran-kern **12b** zugefüttert (Abbildung 72B). Dieses wurde nicht zum erwarteten Aldehyd **14b** umgesetzt, was dadurch bestätigt wurde, dass im EIC für das $[M-H]^-$ -Ion von **14b** kein Signal auftritt. Auch die EICs für andere Addukte wie z.B. $[M-H+HCOOH]^-$, $[M-H_2+Na]^-$, $[2M-H]^-$ oder $[2M-H+HCOOH]^-$ wiesen kein passendes Signal auf (Daten nicht gezeigt). Stattdessen wurde ein neues Produkt gebildet, was bisher noch nicht weitergehend untersucht werden konnte (Abbildung 72Bi und C).

4.1.8 Positive Regulation der Flavoglucinbiosynthese durch FogI

4.1.8.1 Deletion von *fogl* in *Aspergillus nidulans* JN004

Das letzte Gen im *fog*-Cluster *fogl* hat vermutlich keine biosynthetisch relevante Funktion. Eine Analyse der Proteinsequenz von FogI mit der NCBI *conserved domain database* ergab, dass sich innerhalb der ersten 45 N-terminalen Aminosäuren eine GAL4-ähnliche Zn(II)₂Cys₆-binuklear-Cluster DNA-Bindedomäne zu finden ist. Wie in Kapitel 1.5.4 erläutert, tritt diese hauptsächlich in Transkriptionsregulatoren von Pilzen auf, was darauf schließen lässt, dass FogI eine regulatorische Funktion in Bezug auf die Flavoglucinbiosynthese einnehmen könnte. Sein Einfluss auf die Produktion von Flavoglucin und seinen Analoga sollte durch Deletion von *fogl* im Clusterexpressionsstamm *A. nidulans* JN004 näher untersucht werden.

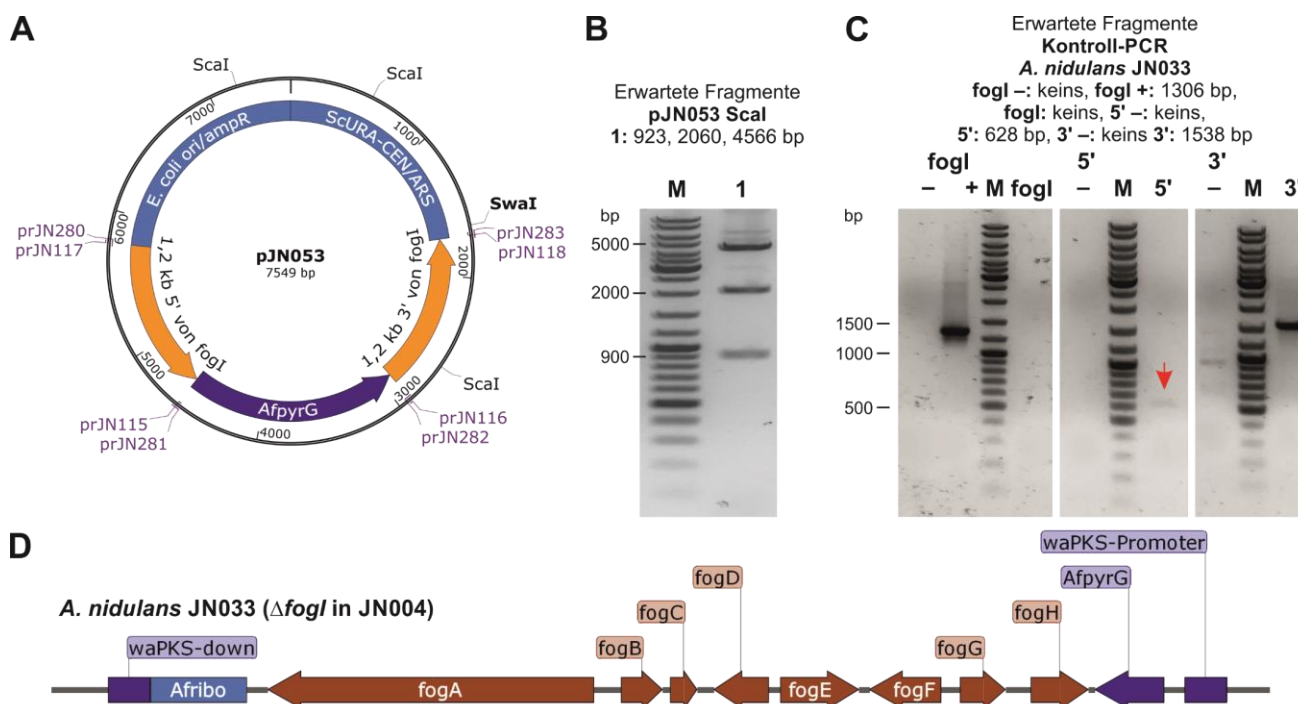


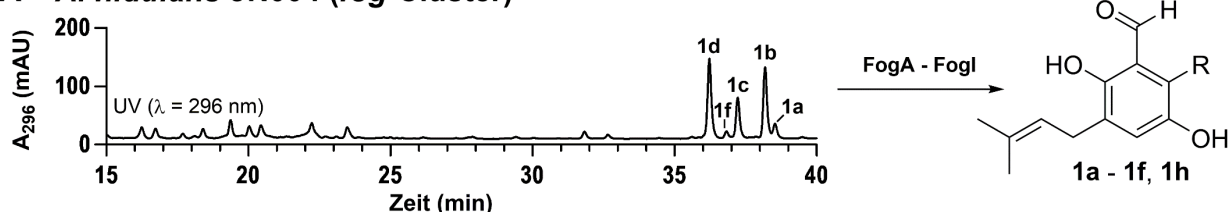
Abbildung 73: Kontrolle von pJN053 und dem $\Delta fogI$ -Stamm *A. nidulans* JN033

Plasmidkarte von pJN053 (**A**). Restriktionsverdau von pJN053 mit *ScaI* (Erwartete Fragmente 923, 2060, 4566 bp) (**B**). Kontroll-PCR für den $\Delta fogI$ -Stamm *A. nidulans* JN033 (Erwartete Fragmente: *fogl*: keins, 5': 628 bp, 3': 1538 bp) (**C**). Genotyp von *A. nidulans* JN033 (**D**).

Die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche von *fogl* wurden mit den Primerpaaren prJN280/281 und prJN282/283 von *A. ruber* QEN-0407-G2 gDNA amplifiziert. Durch HR in *S. cerevisiae* wurden die Flan-

ken mit *AfpYrG* und dem Rückgrat von pYWB2 zu dem *fogl*-Deletionsplasmid pJN053 kloniert (Abbildung 73A). Über einen Restriktionsverdau mit *ScaI* wurde pJN053 überprüft (Abbildung 73B; Erwartete Fragmente: 923, 2060, 4566 bp). Das *SwaI* linearisierte pJN053 wurde dazu genutzt Protoplasten von *A. nidulans* JN004 zu transformieren. Dadurch entstand der $\Delta fogl$ -Stamm *A. nidulans* JN033 (Abbildung 73D). Die Deletion des Gens wurde durch PCR mit den Primern prJN296 und prJN297 bestätigt (Erwartetes Fragment: keins; Positivkontrolle: 1306 bp). Über PCR mit den Primerpaaren prJN104/167 (Erwartetes Fragment: 628 bp) und prJN168/171 (Erwartetes Fragment: 1538 bp) wurde die korrekte Integration der Flanken überprüft (Abbildung 73C).

A *A. nidulans* JN004 (*fog*-Cluster)



B *A. nidulans* JN033 ($\Delta fogl$ in JN004)

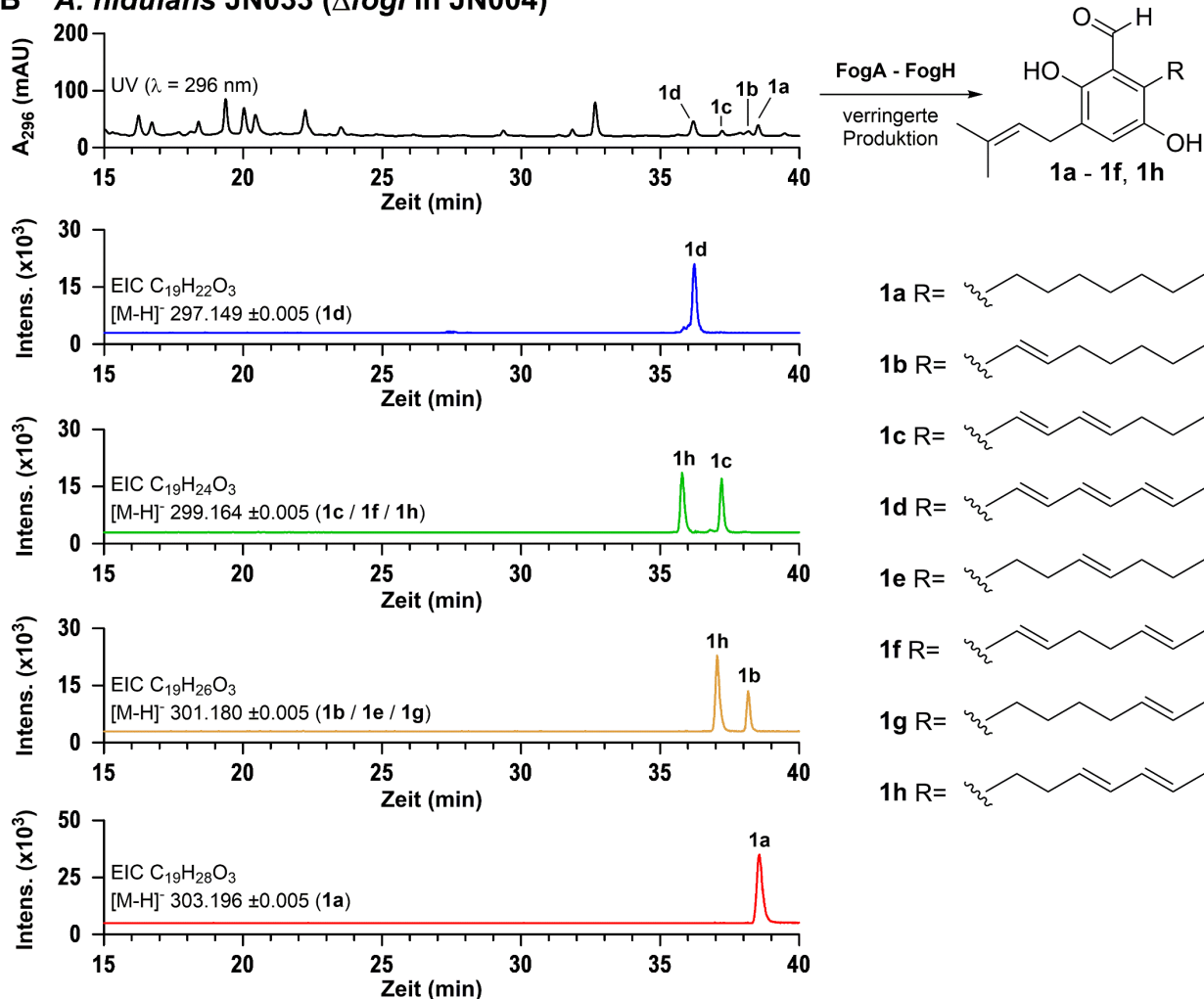


Abbildung 74: LC-MS-Analyse des Rohextrakts der $\Delta fogl$ -Mutante *A. nidulans* JN033

Im Vergleich zum Clusterexpressionsstamm JN004 (A) zeigte die $\Delta fogl$ -Mutante JN033 (B) eine verringerte Produktion der Clusterendprodukte 1a – 1h. Fogl scheint daher als ein positiver Regulator für den *fog*-Cluster zu dienen.

A. nidulans JN033 wurde auf 25 g Reismedium bei 25°C inkubiert. Eine Probe nach 10 Tagen wurde mit Ethylacetat extrahiert und per LC-MS analysiert. Flavoglaucin (**1a**) und seine Analoga **1b** – **1d**, sowie Spuren von **1e**, **1f** und **1h** konnten detektiert werden (Abbildung 74B). Allerdings wurde von allen Produkten, verglichen mit dem *fog*-Cluster Expressionsstamm *A. nidulans* JN004 (Abbildung 74A), signifikant weniger produziert. **1f** und **1h** konnten sogar nur als Spur in der Masse detektiert werden. Wie in JN004 wurde auch hier kein **1g** gebildet. Die verringerte Produktion der Clusterendprodukte deutet darauf hin, dass FogI als positiver Regulator des *fog*-Clusters fungiert, wie es auch schon für andere Transkriptionsfaktoren im Sekundärstoffwechsel berichtet wurde.^{170,442}

4.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie

4.2.1 Bioinformatische Analyse des Genclusters für die Echinulin-Biosynthese

In Kapitel 1.4.2 wurde schon näher beschrieben, dass Indolalkaloide der Echinulin-Familie aus verschiedenen Pilzspezies isoliert wurden, unter anderem auch aus Ascomyceten der *A. glaucus* Gruppe wie *A. ruber*, *A. glaucus* oder *A. cristatus*.^{67,99,443} Diese Substanzklasse war schon zuvor Gegenstand zweier Studien in unserer Arbeitsgruppe, die sich hauptsächlich auf die kaskadischen Prenylierungsreaktionen und das Erproben der Substratspektren der Prenyltransferasen EchPT1 und EchPT2 aus *A. ruber* fokussierten.^{118,444}

Durch Genome Mining wurden in der ersten dieser Studien drei homologe Gencluster in den *A. ruber*, *A. glaucus* und *A. cristatus* Genomen identifiziert.¹¹⁸ Im Genom des sequenzierten *A. ruber* CBS135680 ist dieser Cluster auf dem scaffold00003 der *whole genome shotgun sequence* (GenBank-ID: KK088413) zu finden. Der identifizierte Cluster in *A. ruber* enthält Gene, die potenziell für eine NRPS (EYE98744, EchPS), ein Cytochrom P450 Enzym (EYE98745, EchP450) und zwei Prenyltransferasen (EYE98742, EchPT1 und EYE98746, EchPT2) kodieren (Abbildung 75; Tabelle 60). Biochemische Untersuchungen mit überproduziertem und gereinigtem rekombinantem Protein zeigten, dass EchPT1 die reverse C2-Prenylierung von cyclo-L-Trp-L-Ala (**15**; Abbildung 76) katalysiert. Das Produkt von EchPT1 Preechinulin (**16**) wird anschließend durch zwei aufeinander folgende Prenylierungsreaktionen, katalysiert durch EchPT2, über Tardioxopiperazin A (**17**) zu Echinulin (**19**) umgesetzt. Dabei kann ein Shuntprodukt **18** gebildet werden. In dieser Studie wurde postuliert, dass EchP450 beide *exo*-Doppelbindungen benachbart zum Diketopiperazinring installiert und allein für die Bildung von Stoffen der Neoechinulin A- (Δ^{10}) und Neoechinulin B- ($\Delta^{10,14}$) Serie verantwortlich ist. Jedoch lagen keine experimentellen Daten vor, um diese Hypothese zu unterstützen. Außerdem wurde die eindeutige Bestätigung, dass der identifizierte Cluster für die Biosynthese der Echinuline zuständig ist, auch noch nicht erbracht. Stromaufwärts von *echPT2* liegen weitere Gene, die nach der ersten Analyse ihrer Funktion, keine für die Echinuline biosynthetische Relevanz aufweisen. In Kapitel 4.2.5 wird erläutert, warum drei dieser Gene aufgrund ihrer möglichen Oxidoreduktase-Aktivität dennoch von größerem Interesse waren.

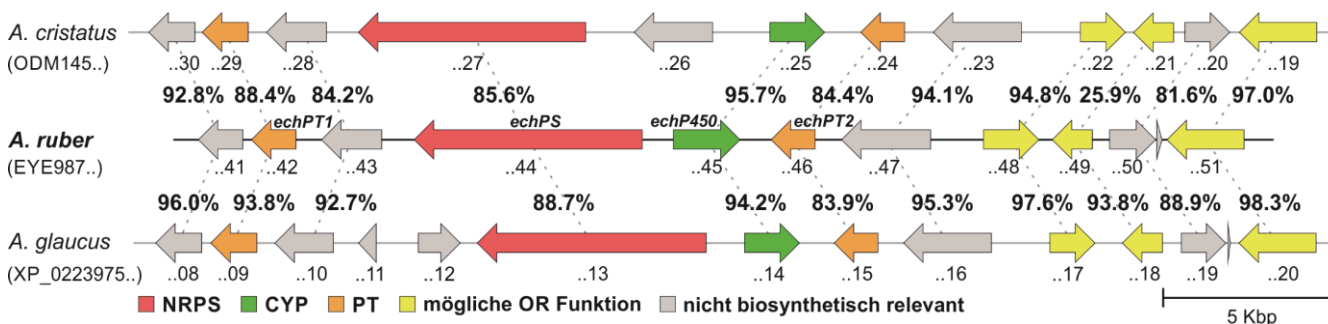


Abbildung 75: Vergleich des *ech*-Clusters und seiner umgebenden Gene aus *A. ruber* mit seinen Homologen in *A. cristatus* und *A. glaucus*

Die Accession-number ist unter den jeweiligen Genen notiert. Die Wiedergabe der Identität in Prozent bezieht sich auf die Aminosäuresequenz der kodierten Proteine. Der *ech*-Kerncluster umfasst die Gene von *echPT1* (EYE98742) bis *echPT2* (EYE98746).

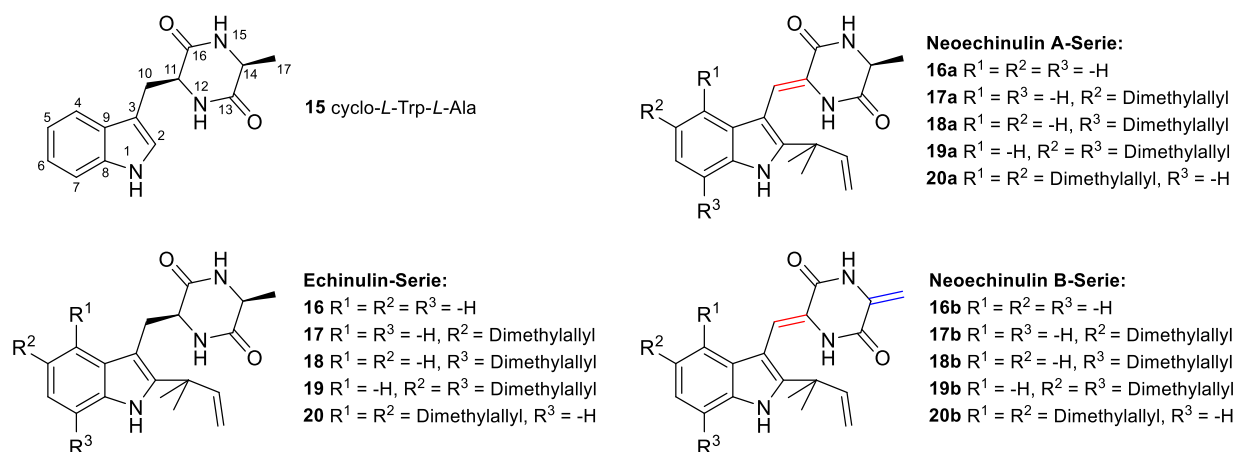
Tabelle 60: Putative Funktionen der Proteine kodiert durch den *ech*-Cluster und seine umgebenden Gene in *A. ruber*

Gen	Länge (in bp)	Protein	Länge (in AA)	Putative Funktion
EURHEDRAFT_409074	1116	EYE98741	371	Neuraminidase
<i>echPT1</i> (EURHED-RAFT_448612)	1302	EchPT1 (EYE98742)	417	Prenyltransferase
EURHEDRAFT_383835	1752	EYE98743	480	Genereller Substrat Transporter
<i>echPS</i> (EURHED-RAFT_472053)	6654	EchPS (EYE98744)	2113	Nicht-ribosomale Peptid Synthetase
<i>echP450</i> (EURHED-RAFT_409075)	1605	EchP450 (EYE98745)	534	Cytochrom P450
<i>echPT2</i> (EURHED-RAFT_448141)	1280	EchPT2 (EYE98746)	409	Prenyltransferase
EURHEDRAFT_528589	2564	EYE98747	767	β-D-Glucosidase M
EURHEDRAFT_409077	1266	EYE98748	421	NADH-abhängige Flavin Oxidoreduktase
EURHEDRAFT_374803	1172	EYE98749	352	Enoyl-Reduktase / Chaperon
EURHEDRAFT_383841	1317	EYE98750	422	Salicylat Hydroxylase
EURHEDRAFT_t31	72	-	-	tRNA
EURHEDRAFT_400000	2250	EYE98751	695	Acyl-CoA Oxidase

Die Gene des *ech*-Clusters sind mit *echPT1* – *echPT2* benannt und von den umliegenden Genen durch die Trennlinien in der Tabelle zu unterscheiden.

4.2.2 Produktion von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie in *Aspergillus ruber* QEN-0407-G2

Wie für Flavoglaucin und seine Analoga zuvor wurde hier zunächst bestätigt, dass der vorhandene Organismus *A. ruber* QEN-0407-G2 wirklich Substanzen der Echinulin-Familie (Abbildung 76) produzieren kann, bevor mit ihm weitere Arbeiten durchgeführt werden. Dazu wurde *A. ruber* auf 25 g Reismedium bei 25°C inkubiert. Eine Probe nach 14 Tagen wurde mit Ethylacetat extrahiert und der Extrakt wurde *via* LC-MS analysiert (Abbildung 77).

**Abbildung 76: Strukturen von Vertretern der Echinulin-Familie**

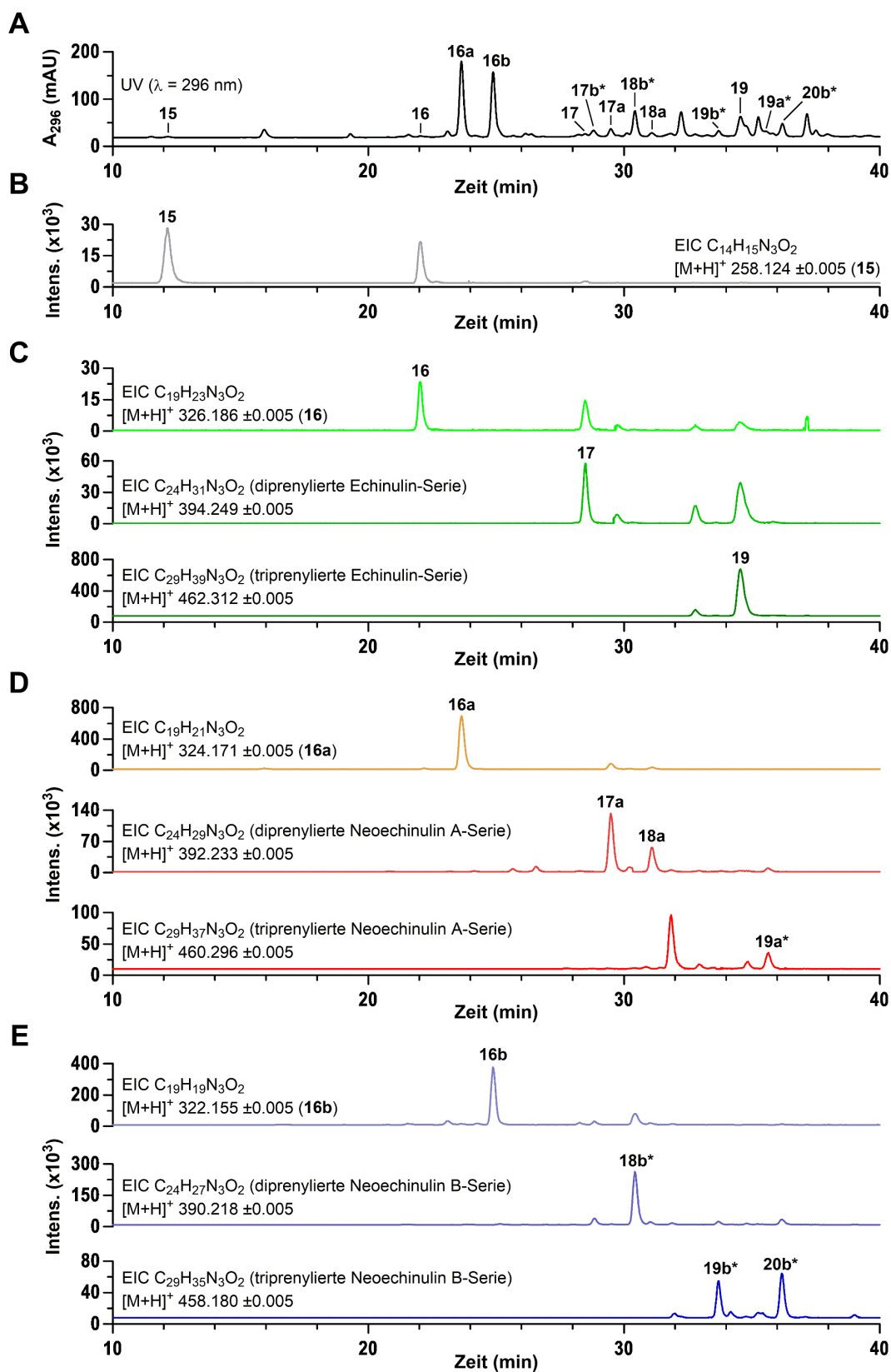


Abbildung 77: LC-MS Analyse des Extrakts von *A. ruber* QEN-0407-G2

Neben dem UV-Chromatogramm (A) sind die EICs für die Massen von 15 (B), der Echinulin-Serie (C), der Neoechinulin A-Serie (D) und der Neoechinulin B-Serie (E) dargestellt.

Im Extrakt wurden insgesamt mehr Vertreter der Neoechinulin A- und B-Serie beobachtet als Substanzen ohne eine *exo*-Doppelbindung. Neoechinulin A (**16a**) und Neoechinulin B (**16b**) stellten hierbei die Hauptprodukte dar, während ein diprenyliertes (mit hoher Wahrscheinlichkeit **18b**) und zwei triprenylierte Derivate Echinulin (**19**) und wahrscheinlich **20b** in moderater Menge gebildet wurden. Die prominenteste Substanz der Echinulin-Serie war Echinulin (**19**) selbst. Andere Indolalkaloide der Echinulin-Familie konnten nur in geringerer Quantität detektiert werden.

Die Identifikation der Substanzen erfolgte basierend auf ihrer Isolierung und Strukturaufklärung *via* $^1\text{H-NMR}$ (siehe Kapitel 4.2.4) oder waren bereits als authentischer Standard vorhanden. Die Substanzen, die im weiteren Verlauf des Projekts nicht isoliert und eindeutig bestätigt wurden, wurden anhand ihrer Masse in Kombination mit ihrem Elutionsverhalten, welches schon in der zuvor zitierten Studie beobachtet werden konnte, zugeordnet und sind mit einem * gekennzeichnet.¹¹⁸

4.2.3 Heterologe Expression des *ech*-Clusters in *Aspergillus nidulans* LO8030

In Kapitel 4.1.3 und 4.1.4 wurde bereits näher erläutert, warum die genetische Manipulation des Ursprungsorganismus *A. ruber* QEN-0407-G2 nicht für die Untersuchung der Biosynthesecuster verwendet werden konnte und welche Vorteile im Vergleich dazu die heterologe Expression bietet. Aus diesem Grund wurde hier nicht erneut versucht, Gene in *A. ruber* zu deletieren, sondern der *ech*-Cluster sollte, wie zuvor der *fog*-Cluster, in *A. nidulans* LO8030 exprimiert werden, um einen experimentellen Beweis dafür zu liefern, dass dieser für die Produktion von Substanzen der Echinulin-Familie verantwortlich ist.

Dazu wurden die, wie angenommen, essenziellen Gene *echPT1* – *echPT2* (EURHEDRAFT_448612 – EURHEDRAFT_448141 + 500 bp stromabwärts von *echPT1* und stromaufwärts von *echPT2*; bp 1198299-1215739; unplaced genomic scaffold00003; *A. ruber* CBS135680 Genom, GenBank: KK088413) des *ech*-Clusters mit den Primern prJN235 – prJN238 in vier Fragmenten von *A. ruber* QEN-0407-G2 gDNA amplifiziert. Die Primer wurden so designt, dass alle Fragmente einen 154 – 170 bp homologen Überhang zueinander aufwiesen. Das erste und das letzte Fragment besaßen einen jeweils 30 bp langen homologen Bereich zu dem mit BamHI linearisierten Integrationsvektor pYWB2. Durch HR in *S. cerevisiae* wurde der Vektor mit allen Fragmenten zum Expressionplasmid pJN037 kloniert (Abbildung 78A). pJN037 wurde über einen Kontrollverdau mit BamHI auf seine Korrektheit überprüft (Abbildung 78B; Erwartete Fragmente: 250, 1780, 2213, 4192, 6689, 10120 bp). Nach dem Linearisieren von pJN037 mit *Swa*I wurden damit *A. nidulans* LO8030 Protoplasten transformiert und durch Integration in den *wA*-PKS-Lokus entstand der Stamm *A. nidulans* JN019 (Abbildung 78E). Die korrekte Integration wurde durch eine PCR mit den Primern prJN023 und prJN024 überprüft (Abbildung 78C; Erwartetes Fragment: 1664 bp) und durch die Änderung des grünen zum weißen Phänotyp bestätigt (Abbildung 78D).

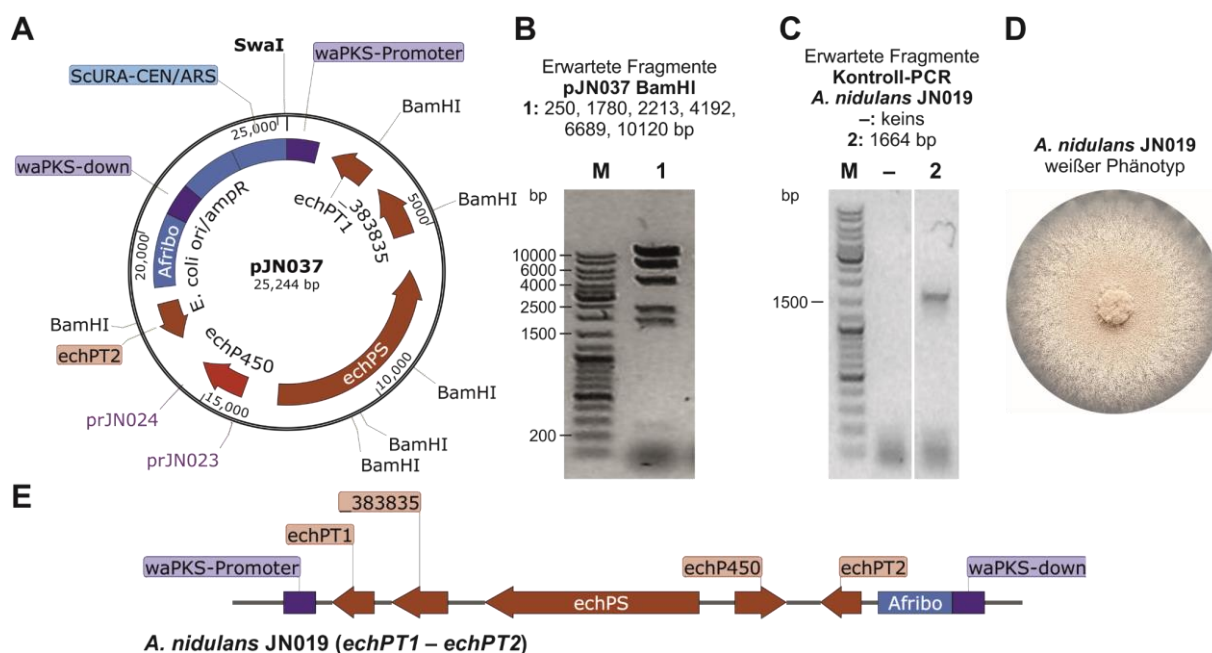


Abbildung 78: Kontrolle von pJN037 und dem *ech*-Cluster Expressionsstamm *A. nidulans* JN019

Plasmidkarte von pJN037 (A). Restriktionsverdau von pJN037 mit BamHI (Erwartete Fragmente: 250, 1780, 2213, 4192, 6689, 10120 bp) (B). Kontroll-PCR für *A. nidulans* JN019 (Erwartetes Fragment: 1664 bp) (C). Weißer Phänotyp von *A. nidulans* JN019 (D). Genotyp von *A. nidulans* JN019 (E).

Der *ech*-Cluster Expressionsstamm *A. nidulans* JN019 wurde auf 25 g Reismedium bei 25°C inkubiert. Eine Probe nach 10 Tagen wurde mit Ethylacetat extrahiert und mittels LC-MS analysiert (Abbildung 80). Dabei konnten im Vergleich mit dem Extrakt der Negativkontrolle *A. nidulans* JN002 (Abbildung 79) mehrere neue Produkte detektiert werden. Wie auch im Ursprungsorganismus *A. ruber* war Neoechinulin A (**16a**) hier das Hauptprodukt der Neoechinulin A-Serie, gefolgt von Echinulin (**19**) als Hauptprodukt der Echinulin-Serie und einer signifikanten Menge **17a**. Geringe Mengen der Substanzen **15**, **16**, **17** und **18a** waren ebenfalls vorhanden. Die Ionisierung der mehrfach prenylierten Substanzen (z.B. **17** oder **19**) resultiert in der Fragmentierung und dem damit einhergehenden Verlust von Prenylgruppen. Darum sind beispielsweise im EIC der Masse der zweifach prenylierten Echinulin-Serie auch Signale bei der Retentionszeit vom dreifach prenylierten Echinulin (**19**) zu erkennen (Abbildung 80C). Überraschenderweise wurden im Extrakt von JN019 keine Metabolite der Neoechinulin B-Serie detektiert. Selbst in der Masse waren keine Spuren dieser Molekülklasse sichtbar (Abbildung 80E), obwohl Neoechinulin B (**16b**) eines der beiden Hauptprodukte im Ursprungsorganismus *A. ruber* darstellt.

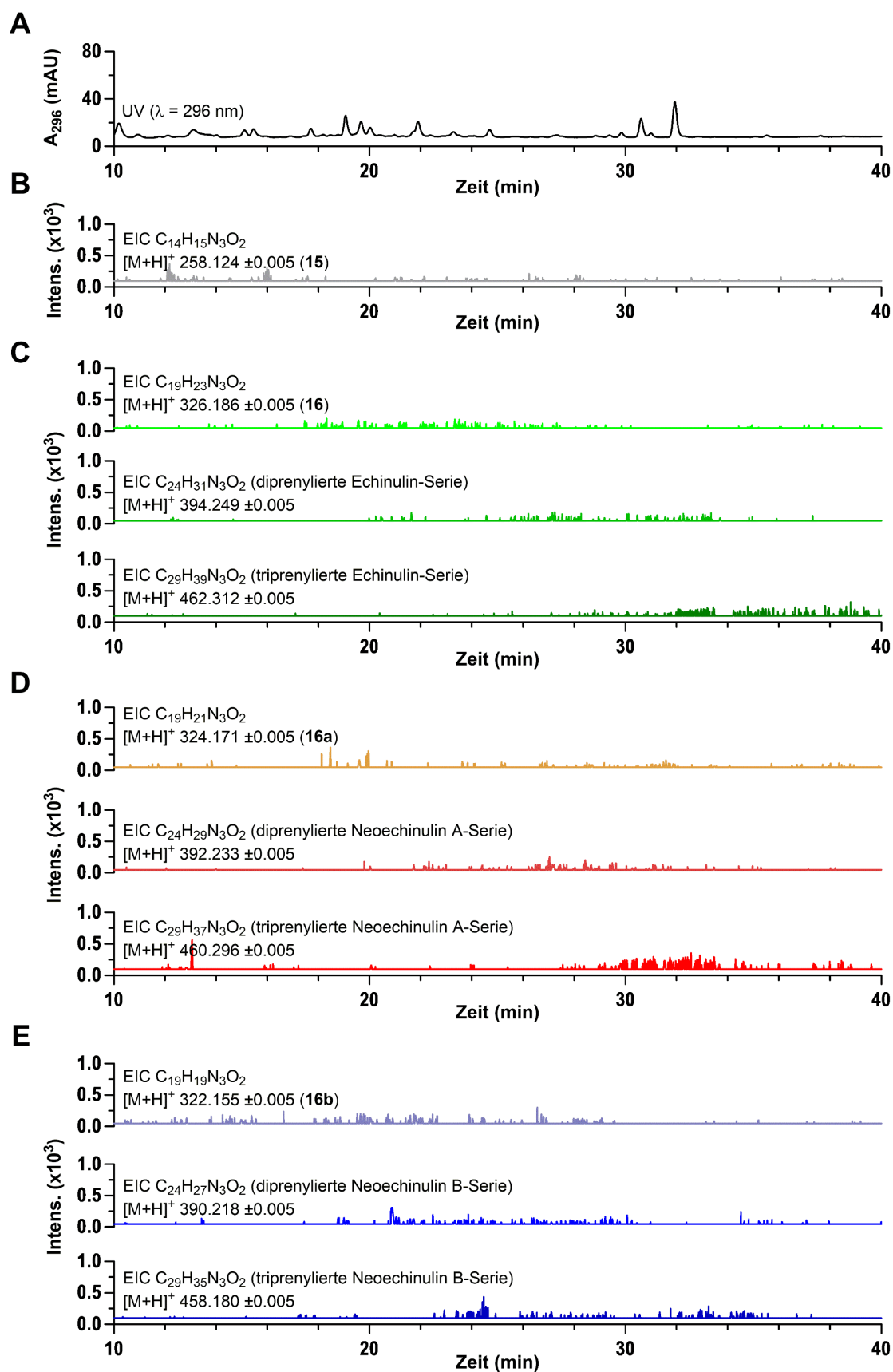


Abbildung 79: LC-MS Analyse des Extrakts des Negativkontrollstamms *A. nidulans* JN002

Neben dem UV-Chromatogramm (A) sind die EICs für die Massen von 15 (B), der Echinulin-Serie (C), der Neoechinulin A-Serie (D) und der Neoechinulin B-Serie (E) dargestellt. *A. nidulans* JN002 stellt keine Substanzen der Echinulin-Familie her.

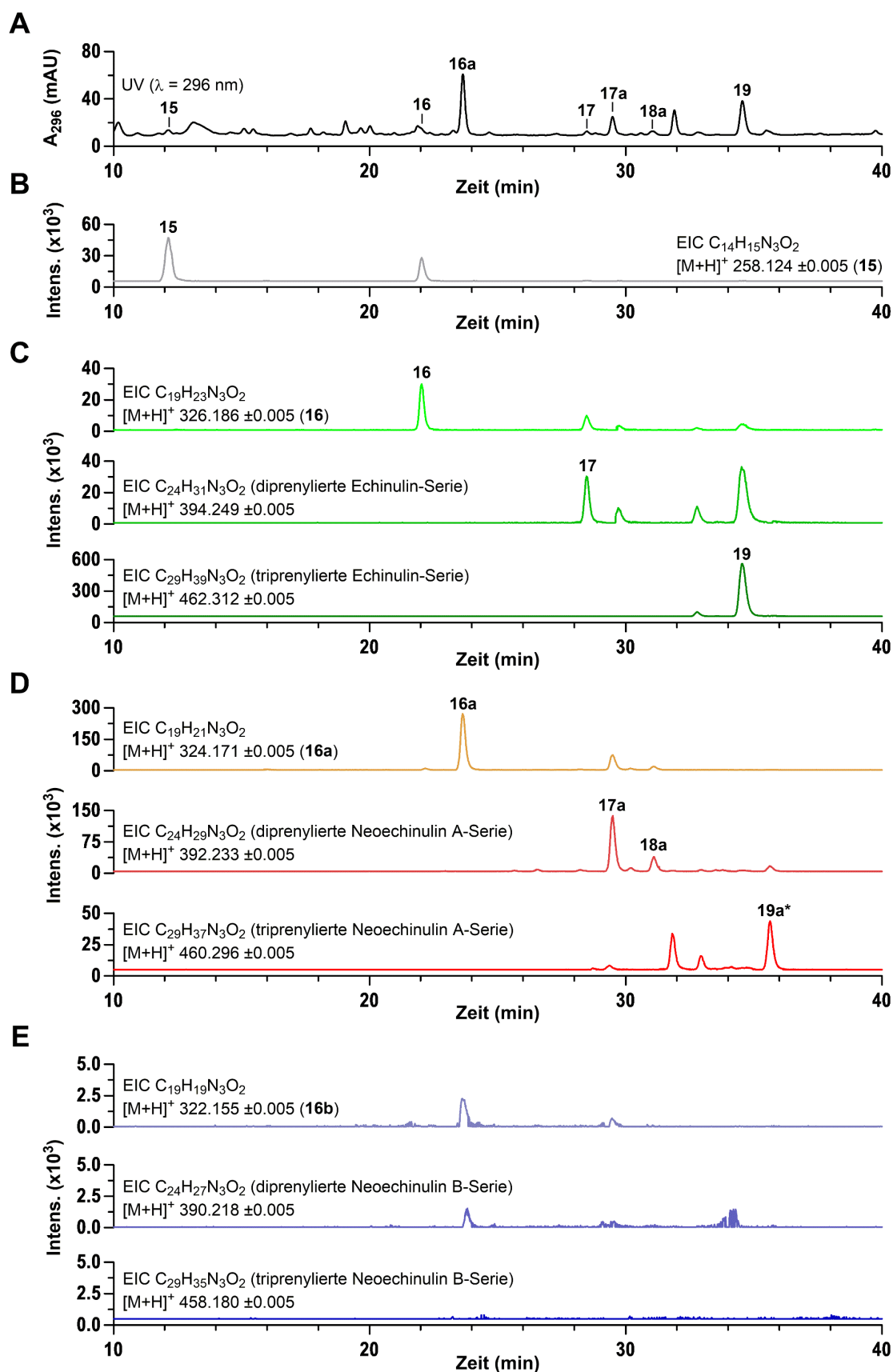


Abbildung 80: LC-MS Analyse des Extrakts des *ech*-Cluster Expressionsstamms *A. nidulans* JN019

Neben dem UV-Chromatogramm (A) sind die EICs für die Massen von 15 (B), der Echinulin-Serie (C), der Neoechinulin A-Serie (D) und der Neoechinulin B-Serie (E) dargestellt.

4.2.4 Identifikation der produzierten Substanzen

Die in *A. nidulans* JN019 produzierten Substanzen wurden isoliert, um ihre Identität zu bestätigen. Dazu wurde JN019 auf 20 x 250 g Reismedium in 2 L Fernbachkolben bei 25°C inkubiert. Nach 14 Tagen wurden die Kulturen mit jeweils 3 x 300 ml Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck an einem Rotationsverdampfer evaporiert, um den getrockneten Rohextrakt der Kulturen zu erhalten (26 g). Der Rohextrakt wurde auf eine Kieselgelsäule aufgetragen und mit einem Petrolether (PE)/Ethylacetat (EtOAc)-Gemisch in einem Gradienten von 10:1 zu 0:1 in 12 Fraktionen (1 – 12) eluiert. Die weitere Elution mit einem EtOAc/Methanol (MeOH)-Gradienten von 8:1 bis 0:1 ergab 9 weitere Fraktionen (13 – 21). **17a** (8,3 mg) und **18a** (1,8 mg) wurden mittels semi-präparativer HPLC mit einem isokratischen Acetonitril (ACN)/H₂O-Gemisch (65:35) aus Fraktion 12 isoliert. **16a** (13,9 mg) konnte über HPLC mit einem isokratischen ACN/H₂O-Gemisch (50:50) aus Fraktion 13 isoliert werden. Die Substanzen **17** (0,4 mg) und **19** (1,3 mg) wurden via HPLC aus Fraktion 15 isoliert. Die beste Auftrennung dafür lieferte ein 6-minütiger ACN/H₂O Gradient von 70 – 85 % ACN, gefolgt von einem isokratischen Schritt mit 90 % ACN für 4,5 min. Von den isolierten Substanzen wurden ¹H-NMR-Spektren aufgenommen (Tabelle 61; Anhang 1).

Das zyklische Dipeptid cyclo-L-Trp-L-Ala (**15**) war als authentischer Standard in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurde nicht weiter charakterisiert. Die Retentionszeit $t_R = 12,2$ min, das UV-Spektrum (Absorptionsmaxima bei $\lambda = 200, 220$ und 280 nm) und die aus der Masse errechnete Summenformel C₁₉H₂₃N₃O₂ (Errechnet: $[M + H]^+ m/z 258.1237$) des Signals in den Extrakten stimmte mit denen des Standards überein (Anhang 2; Abbildung 104A).

Das Produkt der EchPT1 Preechinulin (**16**) wurde nicht aus pilzlichem Extrakt isoliert, sondern aus einem auf 10 ml hochskalierten EchPT1 *in vitro*-Assay mit **15** und DMAPP als Substrat und Cosubstrat wie zuvor beschrieben.¹¹⁸ Die Retentionszeit $t_R = 22,0$ min, das UV-Spektrum (Absorptionsmaxima bei $\lambda = 224$ und 282 nm) und die aus der Masse errechnete Summenformel C₁₉H₂₃N₃O₂ (Errechnet: $[M + H]^+ m/z 326.1863$) des Signals aus den Pilzextrakten stimmte mit dem EchPT1-Produkt Preechinulin (**16**) überein und wurde deswegen auch nicht weiter charakterisiert (Anhang 2; Abbildung 104B).

Anhand der Masse von **16a** $[M + H]^+ m/z 324.1730$ konnte eine Summenformel von C₁₉H₂₁N₃O₂ errechnet werden (Errechnet: $[M + H]^+ m/z 324.1707$). Die Masse und die Signale des ¹H-NMR-Spektrums, aufgenommen in DMSO-*d*₆ (Anhang 1, Abbildung 99), stimmen mit denen von Neoechinulin A überein.^{118,445}

Auch Neoechinulin B (**16b**) war schon als Standard verfügbar (Anhang 2; Abbildung 105D). Die Parameter wie Retentionszeit $t_R = 24,9$ min, das UV-Spektrum (Absorptionsmaxima bei $\lambda = 224, 272$ und 370 nm) und die aus der Masse errechnete Summenformel C₁₉H₁₉N₃O₂ (Errechnet: $[M + H]^+ m/z 322.1550$) stimmt mit den Signalen in den Extrakten überein.

Für **17** konnte basierend auf der Masse $[M + H]^+$ m/z 394.2508 eine Summenformel von $C_{24}H_{31}N_3O_2$ vorausgesagt werden (Errechnet: $[M + H]^+$ m/z 394.2489). Zusammen mit dem in DMSO- d_6 aufgenommenen 1H -NMR-Spektrum (Anhang 1, Abbildung 100) konnte **17** eindeutig als das an C5 prenylierte Preechinulinderivat Tardioxopiperazin A identifiziert werden.^{118,446}

Die Masse von **17a** wies mit $[M + H]^+$ m/z 392.2337 auf eine Summenformel von $C_{24}H_{29}N_3O_2$ hin (Errechnet: $[M + H]^+$ m/z 392.2333). Das 1H -NMR-Spektrum wurde in Aceton- d_6 aufgenommen (Anhang 1, Abbildung 101) und die Signale stimmen mit denen von Isoechinulin A, dem an C5 prenylierten Derivat von Neoechinulin A, überein.⁴⁴⁶

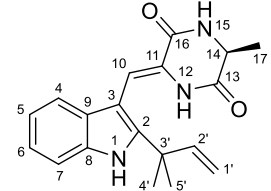
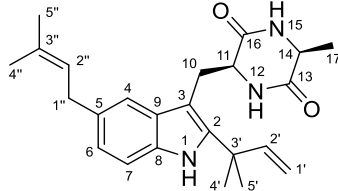
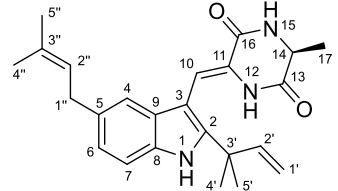
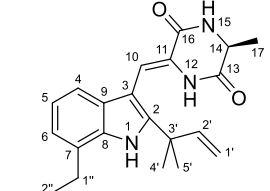
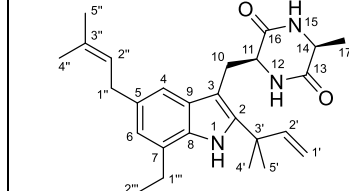
Tardioxopiperazin B (**18**) war ebenfalls in geringer Menge als Standard vorhanden (Anhang 2; Abbildung 104D). Hier stimmten in den Extrakten die Signale mit einer Retentionszeit $t_R = 29,7$ min, einem UV-Spektrum (Absorptionsmaxima bei $\lambda = 224$ und 282 nm) und der aus ihrer Masse errechneten Summenformel $C_{24}H_{31}N_3O_2$ (Errechnet: $[M + H]^+$ m/z 394.2489) mit dem Standard überein.

Für **18a** wurde basierend auf seiner Masse $[M + H]^+$ m/z 392.2340 die gleiche Summenformel $C_{24}H_{29}N_3O_2$ wie für **17a** kalkuliert, was darauf hinwies, dass es sich dabei um ein Isomer handelt. Das in DMSO- d_6 aufgenommene 1H -NMR-Spektrum (Anhang 1, Abbildung 102) zeigte, dass **18a** den Prenylrest nicht an C5 sondern an C7 trug und konnte somit als Variecolorin G identifiziert werden.¹¹⁴

Die kalkulierte Summenformel $C_{29}H_{39}N_3O_2$ (Errechnet: $[M + H]^+$ m/z 462.3115) für **19** ($[M + H]^+$ m/z 462.3130) ließ darauf schließen, dass diese Substanz insgesamt drei Prenylgruppen trägt. Die Signale des in DMSO- d_6 aufgenommenen 1H -NMR-Spektrums (Anhang 1, Abbildung 103) stimmten mit denen von Echinulin überein, welches neben der für alle Moleküle der Echinulin-Familie gemeinen reversen C2-Prenylierung, am Indolring an den Positionen C5 und C7 zwei weitere Prenylgruppen trägt.¹¹⁸

Alle anderen Substanzen der Echinulin-Familie wurden nicht eindeutig identifiziert, sondern wie schon in Kapitel 4.2.2 erwähnt, basierend auf ihrem Retentionsverhalten zueinander und zu den bekannten Substanzen in Verbindung mit ihren Massen zugeordnet. Diese Substanzen sind in den Abbildungen mit einem * neben ihrer Nummer gekennzeichnet.

Tabelle 61: ¹H-NMR Daten von 16a, 17, 17a, 18a und 19 isoliert aus *A. nidulans* JN019

Position	 Neoechinulin A (16a) in DMSO- <i>d</i> ₆	 Tardioxopiperazin A (17) in DMSO- <i>d</i> ₆	 Isoechinulin A (17a) in Aceton- <i>d</i> ₆	 Variecolorin G (18a) in DMSO- <i>d</i> ₆	 Echinulin (19) in DMSO- <i>d</i> ₆
	δ _H (ppm), Multipllett, J (Hz)	δ _H (ppm), Multipllett, J (Hz)	δ _H (ppm), Multipllett, J (Hz)	δ _H (ppm), Multipllett, J (Hz)	δ _H (ppm), Multipllett, J (Hz)
NH-1	10.99, s	10.36, s	10.19, s	10.23, s	9.62, s
4	7.16, d, 8.1	7.17, br s	7.02, s	6.97, d, 7.9	7.01, s
5	6.98, ddd, 8.1, 7.0, 1.1			6.91, dd, 7.9, 7.2	
6	7.05, ddd, 8.1, 7.0, 1.1	6.80, dd, 8.2, 1.7	6.93, dd, 8.2, 1.7	6.82, d, 7.2	6.60, s
7	7.39, dt, 8.1, 1.1	7.18, d, 8.2	7.27, d, 8.2		
10a	6.86, s	2.98, dd, 14.4, 9.5	7.07, br s	6.84, s	2.98, dd, 14.4, 9.5
10b		3.30 [#]			3.30, dd, 14.4, 4.1
11		3.92, dt, 9.5, 3.7			3.89, td, 9.5, 4.1
NH-12	8.27, s	8.11, d, 2.9	7.90, s	8.55, s	7.34, d, 3.1
14	4.13, qd, 7.0, 2.0	3.77, qd, 7.1, 2.8	4.23, qd, 7.0, 2.1	4.11, qd, 6.9, 1.9	3.78, qd, 7.1, 2.9
NH-15	8.57, s	7.34, d, 2.7	7.39, s	8.27, d, 1.7	8.11, d, 2.9
17	1.35, d, 7.0	1.27, d, 7.1	1.51, d, 7.0	1.33, d, 6.9	1.29, d, 7.1
1'	5.02, dd, 10.5, 1.2	4.99, dd, 10.5, 1.3	5.06, dd, 17.4, 1.1	5.00, dd, 17.1, n.d.	5.00, dd, 10.5, 1.3
	4.99, dd, 17.3, 1.2	5.02, dd, 17.5, 1.3	5.05, dd, 10.5, 1.1	5.01, dd, 10.2, n.d.	5.04, dd, 17.5, 1.3
2'	6.05, dd, 17.3, 10.5	6.12, dd, 17.5, 10.5	6.10, dd, 17.4, 10.5	6.10, dd, 17.1, 10.2	6.18, dd, 17.5, 10.5
4'	1.45, s	1.43, s	1.52, s	1.48, s	1.48, s
5'	1.45, s	1.44, s	1.52, s	1.48, s	1.47, s
1''		3.30 [#]	3.36, d, 7.4	3.61, d, 7.2	3.23 [#]
2''		5.29, t, 7.3	5.32, tdt, 7.4, 2.9, 1.5	5.39, t, 7.2	5.26, t, 7.3
4''		1.66, s	1.68, m	1.71, s	1.65, br S
5''		1.65, s	1.68, m	1.71, s	1.65, br S
1'''					3.53, d, 7.3
2'''					5.34, t, 7.3
4'''					1.70, br S
5'''					1.70, br S

[#]Signale überlappen mit dem von Wasser. Die dazugehörigen Spektren sind in Anhang 5 zu finden.

4.2.5 Erweiterung des *ech*-Clusters um mögliche Oxidoreduktasegene in *Aspergillus nidulans* JN019

Das Resultat der Expression des *ech*-Clusters in *A. nidulans* JN019 legt nahe, dass für die Einführung der zweiten Doppelbindung (Δ^{14}) ein weiteres Enzym benötigt wird. Wie schon in Kapitel 4.1.2 beschrieben, ist es kaum möglich ohne experimentelle Daten die Grenzen eines Genclusters zu bestimmen. Aus diesem Grund wurden die weiteren Gene um den *ech*-Cluster *echPT1* – *echPT2* herum analysiert (Abbildung 75; Tabelle 60). EURHEDRAFT_409074 stromabwärts von *echPT1* kodiert für eine putative Neuraminidase und ist damit höchstwahrscheinlich nicht an der Echinulinbiosynthese beteiligt. EURHEDRAFT_528589 stromaufwärts des zweiten Prenyltransferasegens *echPT2* kodiert für eine putative β -D-Glucosidase M, deren Beteiligung an der Bildung von Alkaloiden der Echinulin-Familie ebenso unwahrscheinlich erscheint. Drei weitere stromabwärts gelegene Gene (EURHEDRAFT_409077, _374803, _400000), die für Enzyme mit einer potenziellen Oxidoreduktasefunktion kodieren, könnten möglicherweise an der Einführung der zweiten Doppelbindung beteiligt sein und damit die Bildung der Neoechinulin B-Serie bewirken. Die Sequenz des von EURHEDRAFT_409077 kodierten Proteins EYE98748 schien in der NCBI Datenbank unzureichend annotiert zu sein, denn nach Analyse mit 2ndFind und FGENESH musste das abgeleitete Protein mit einer annotierten Länge von 351 auf 421 Aminosäuren korrigiert werden.

Durch Erweiterung des *ech*-Kernclusters (*echPT1* – *echPT2*) in *A. nidulans* JN019 mit den genannten Genen sollte überprüft werden, ob die Grenzen des *ech*-Clusters möglicherweise inkorrekt bestimmt wurden und eines der putativen Oxidoreduktasegene für die Bildung der zweiten *exo*-Doppelbindung und damit der Neoechinulin B-Serie verantwortlich ist. Dazu wurden die Gene EURHEDRAFT_528589 – EURHEDRAFT_400000 mitsamt 1506 bp stromabwärts von _538589 und 500 bp stromaufwärts von _400000 mit den Primern prJN333 – prJN337 und prJN343 von *A. ruber* QEN-0407-G2 gDNA amplifiziert. Die PCRs resultierten in drei Fragmenten mit jeweils 224 – 249 bp homologem Überhang zueinander. Die beiden äußeren Fragmente wiesen einen, durch die Primer eingeführten, 30 bp langen Überhang zum PCR-linearisierten Rückgrat von pYH-*wA-AfpYrG* auf. Dieser Vektor trägt anstelle des schon in *A. nidulans* JN019 integrierten *AfriboB*-Markers den *AfpYrG*-Marker, sodass dieser für die Selektion auf eine weitere Integration verwendet werden konnte. Durch PCR mit dem Primerpaar prJN332/344 wurde nur das Rückgrat von pYH-*wA-AfpYrG*, bestehend aus der ScURA-CEN/ARS für *S. cerevisiae* und dem *E. coli* ori/Amp^R, zusammen mit der *wA*-PKS-down-Region und dem *AfpYrG*-Marker amplifiziert. Da die neuen Gene nahtlos an den *ech*-Kerncluster anschließen sollten, um die genomische Situation in *A. ruber* wiederzuspiegeln wurde der homologe Bereich zum *wA*-PKS-Promotor als Integrationsstelle nicht von pYH-*wA-AfpYrG* mit amplifiziert. Zur direkten Verknüpfung mit der schon zuvor integrierten Sequenz wurde für die Amplifikation des ersten neuen Fragments der Primer prJN333 so designt, dass dieser schon in *echPT2* bindet und das Fragment somit eine 1200 bp lange homologe Sequenz zum Ende des *ech*-Kernclusters aufweist. Zum besseren Verständnis ist die zusätzliche Integration von DNA-Sequenzen an bereits integrierte Elemente schematisch in Abbildung 81A dargestellt.

Durch HR in *S. cerevisiae* wurde das besagte Rückgrat mit den drei Fragmenten zu dem Plasmid pJN074 kloniert (Abbildung 81B). pJN074 wurde durch einen Kontrollverdau mit BamHI überprüft (Abbildung 81C; Erwartete Fragmente: 1405, 2387, 2600, 2993, 4630, 5923 bp). Nach Transformation von *A. nidulans* JN019 Protoplasten entstand der Stamm *A. nidulans* JN044 (Abbildung 81E). Da JN019 schon einen weißen Phänotyp aufweist, konnten die Transformanten nicht mehr einfach über ihre Sporenfarbe unterschieden werden. Stattdessen wurden zwei Kontroll-PCRs mit *A. nidulans* JN044 gDNA durchgeführt (Abbildung 81D). Die PCR zur Kontrolle des Übergangs zwischen dem *ech*-Kerncluster und den neu integrierten Genen wurde mit den Primern prJN348 und vwRbPT2-r2 durchgeführt (Erwartetes Fragment: 1909 bp). Die Überprüfung des Übergangs zwischen den neuen integrierten Genen und dem restlichen *A. nidulans* Genom fand mit den Primern prJN249 und prJN339 statt (Erwartetes Fragment: 3060 bp).

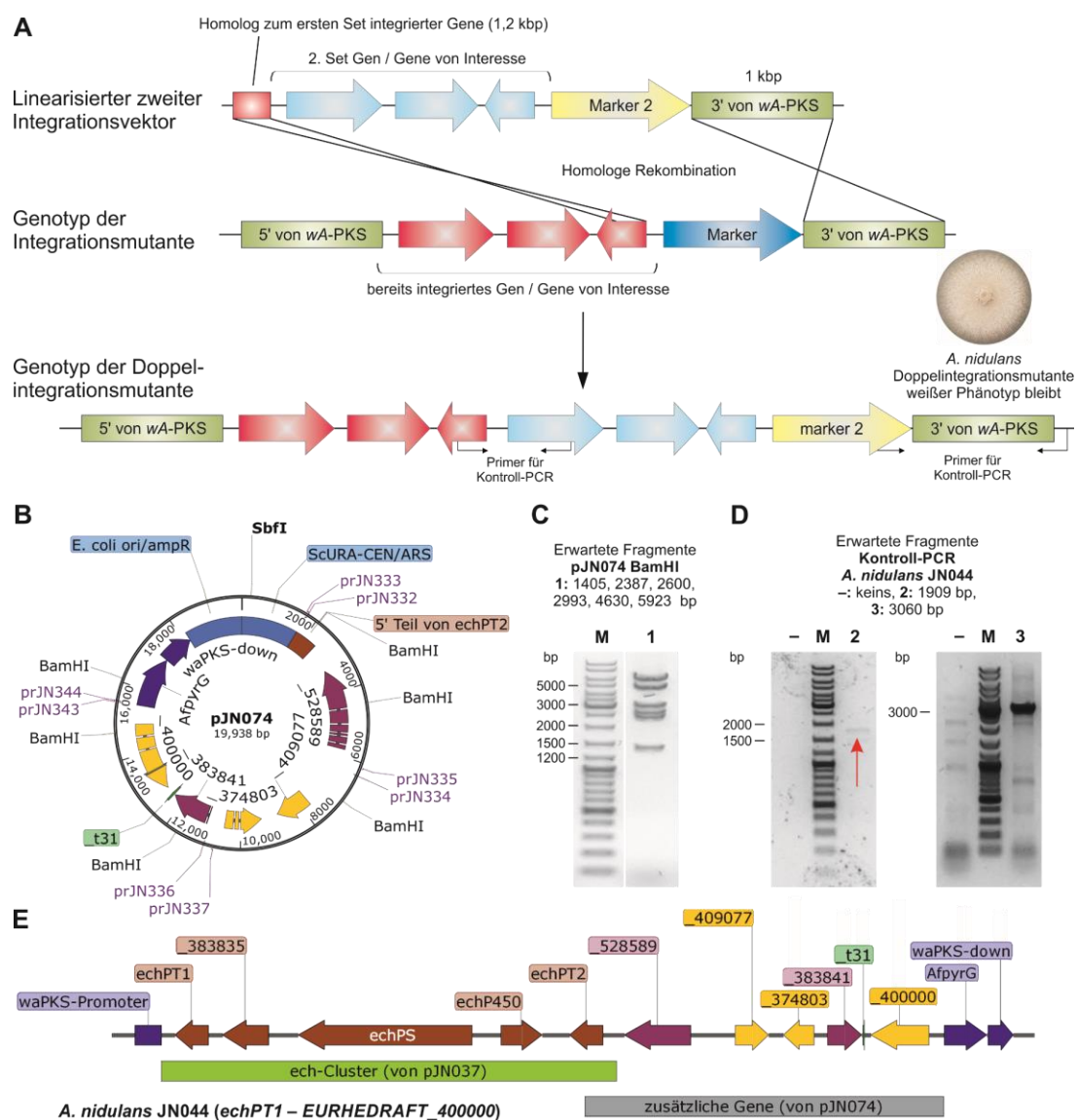


Abbildung 81: Herstellung des Doppelintegrationsstamms *A. nidulans* JN044 durch Erweiterung des *ech*-Clusters

Schematische Darstellung einer nahtlosen, zweiten Integration von Genen in eine bestehende *A. nidulans* Integrationsmutante (A). Plasmidkarte von pJN074 (B). Restriktionsverdau von pJN074 mit BamHI (Erwartete Fragmente: 1405, 2387, 2600, 2993, 4630, 5923 bp) (C). Kontroll-PCRs für *A. nidulans* JN044 (Erwartete Fragmente: 1909 und 3060 bp) (D). Genotyp von *A. nidulans* JN044 (E).

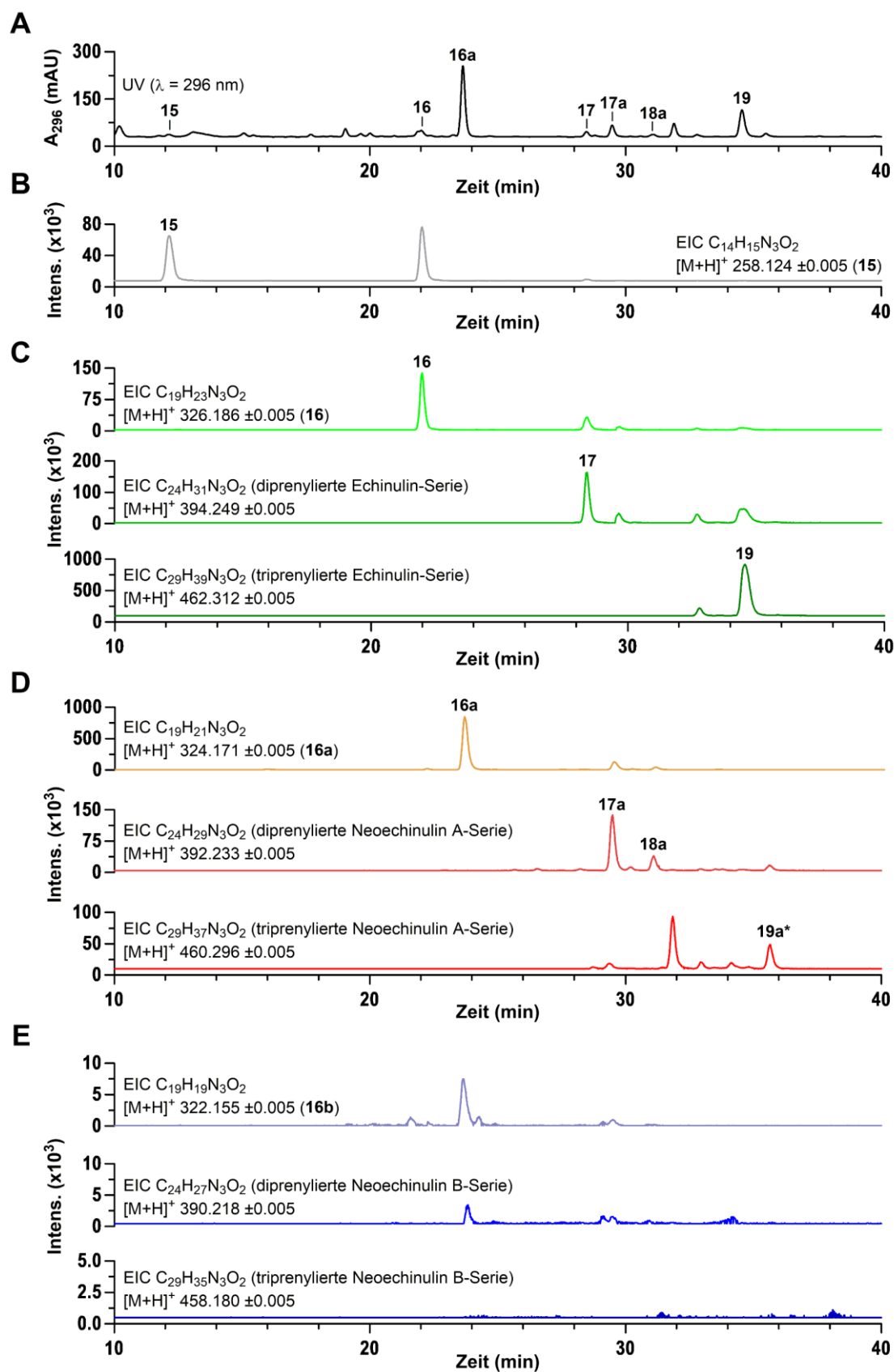


Abbildung 82: LC-MS Analyse des Extrakts von *A. nidulans* JN044 mit erweitertem *ech*-Cluster

Neben dem UV-Chromatogramm (A) sind die EICs für die Massen von 15 (B), der Echinulin-Serie (C), der Neoechinulin A-Serie (D) und der Neoechinulin B-Serie (E) dargestellt.

A. nidulans JN044 wurde wie die anderen Stämme zuvor auch, auf 25 g Reismedium bei 25°C inkubiert. Nach 10 Tagen wurden eine Probe entnommen und mit Ethylacetat extrahiert. Die Analyse des Extrakts erfolgte über LC-MS). Dabei offenbarte sich ein fast identisches Sekundärmetabolitprofil verglichen mit dem *ech*-Cluster Expressionsstamm JN019 (Abbildung 80). Der einzige Unterschied zwischen den beiden Stämmen bestand darin, dass die Produktion von Substanzen der Echinulin-Familie in JN044 deutlich erhöht wurde. So konnten hier z.B. die 4,5-fache Menge Neoechinulin A (**16a**), die 2,4-fache Menge Isoechinulin A (**17a**) und die 3-fache Menge Echinulin (**19**) im Vergleich zum Extrakt von JN019 detektiert werden. Die Verhältnisse zwischen den Produkten veränderte sich nicht signifikant. Auch im Extrakt von JN044 konnten keine Substanzen der Neoechinulin B-Serie entdeckt werden, was beweist, dass die putative β -D-Glucosidase M und die potenziellen Oxidoreduktasen nicht in die Oxidation zur Neoechinulin B-Serie involviert sind.

4.2.6 Die Rolle von EchP450 in der Biosynthese von Alkaloiden der Echinulin-Familie

4.2.6.1 Heterologe Expression von *echP450* in *Escherichia coli*

Die Ergebnisse aus der Expression des *ech*-Kernclusters und seine Erweiterung mit den putativen Oxidoreduktasegenen deuten darauf hin, dass EchP450 nur für die Installation der Doppelbindung zwischen C10 und C11 zuständig ist. Zuvor wurde postuliert, dass auch die zweite Doppelbindung (Δ^{14}) von diesem Enzym eingeführt wird.¹¹⁸ Zur Bestätigung seiner Funktion und seines Substrates sollte EchP450 *in vitro* untersucht und dafür heterolog in *E. coli* produziert werden.

Die aminoterminal Transmembrandomäne pilzlicher CYPs kann zu Problemen bei der heterologen Expression in *E. coli* führen. Die Expression von membrangebundenen Proteinen in diesem Organismus führt in den meisten Fällen zur Bildung von unlöslichen Aggregaten, den *inclusion bodies*. Das ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass *E. coli* keine inneren Organellen besitzt, in die das CYP mit seiner Transmembrandomäne korrekt integriert werden kann. Folglich liegen die hydrophoben Regionen der Domäne frei und agglomerieren so zu *inclusion bodies*.⁴⁴⁷ Außerdem wird von pilzlichen CYPs der Klasse II eine CPR benötigt, um ihr Häm während des katalytischen Zyklus mit reduktionsäquivalenten zu versorgen.⁴⁴⁸ Trotz dieser Hindernisse wurden schon viele eukaryotische CYPs erfolgreich in *E. coli* exprimiert. Zur Vermeidung der genannten Problematik gehen die Trends in der rekombinanten Produktion von CYPs weit über das gewöhnliche Testen von unterschiedlichen Expressionsbedingungen hinaus. Vielmehr wurden die Sequenzen der CYPs zu unterschiedlichen Graden modifiziert. Die Deletion der DNA-Sequenz für die Transmembrandomäne ist die einfachste Modifikation und resultierte auch mehr als nur einmal in der Produktion von aktivem Protein.^{449–451} Alternativ dazu führte in vielen Fällen der Austausch der aminoterminalen Domäne bzw. das Anhängen der Sequenz MALLAVF(L) (eine modifizierte Variante des N-Terminus des bovinen CYP17 α)⁴⁵² zur erfolgreichen Expression von eukaryotischen CYPs in *E. coli*.^{453–457} Eine Vorhersage, inwieweit welche Modifikationen zur funktionellen Expression von CYP-Enzymen in *E. coli* führen, ist nicht möglich, daher sollten, neben der unmodifizierten Expression, beide genannten Varianten getestet werden.

Zunächst wurde die Proteinsequenz von EchP450 auf die Anwesenheit der für CYPs typischen Prolin-reichen Region untersucht. Diese Region ist in CYPs über viele Spezies konserviert und folgt auf den N-terminalen Signalanker (mit Transmembrandomäne) und eine kurze hydrophile Linker-Sequenz.^{458–460} Durch ein *Multiple Sequence Alignment* über Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) mit Sequenzen anderer CYPs konnte diese Region in EchP450 identifiziert werden (Abbildung 83A). Hier wird sie von den Aminosäuren 50 – 57 gebildet. Über den TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) wurden die Aminosäuren 21 – 38 als Transmembrandomäne vorausgesagt (Abbildung 83B).

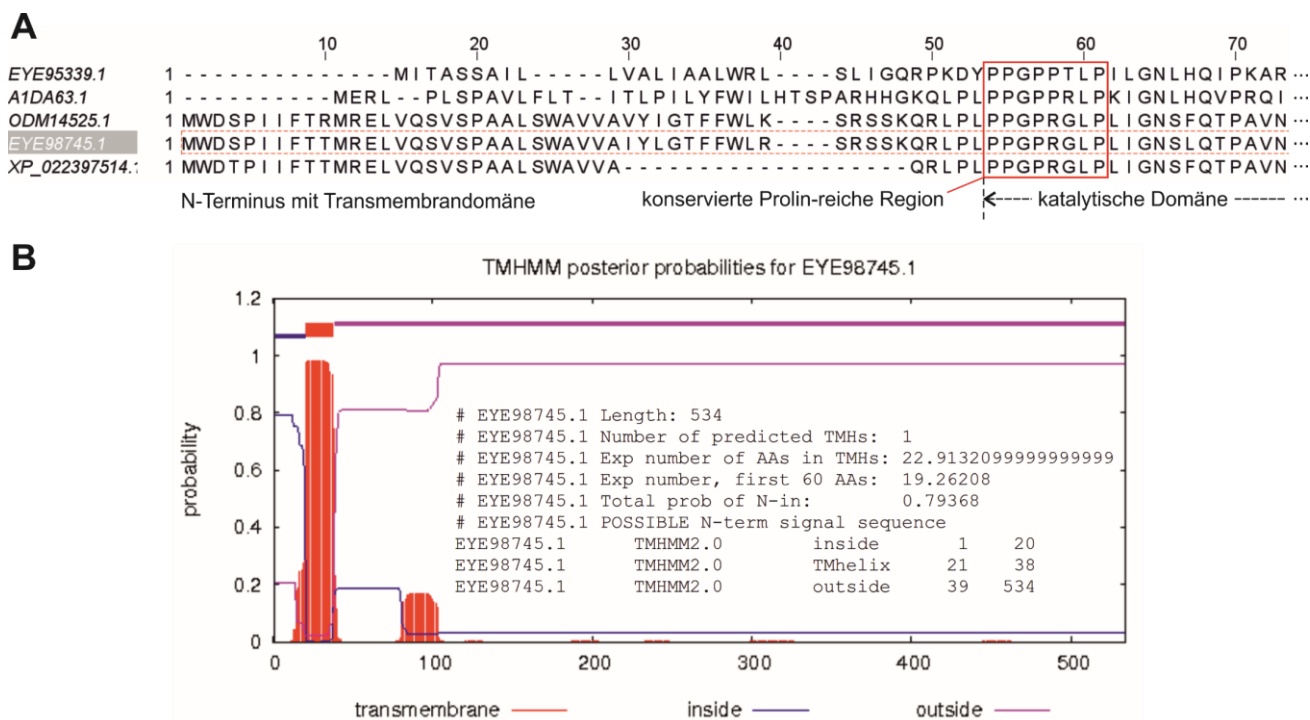


Abbildung 83: Alignment des N-Terminus von EchP450 mit anderen CYPs und Vorhersage der Transmembrandomäne
 Die aminoterminal Region von EchP450 (EYE98745.1) wurde mit seinen Homologen aus *A. glaucus* CBS 516.65 (XP_022397514.1) und *A. cristatus* (ODM14525.1), sowie mit FogE (EYE95339.1) und FtmE (A1DA63.1) aus *A. fischeri* NRRL 181 verglichen, um die konservierte Prolin-reiche Region ausfindig zu machen, die zwischen dem N-Terminus mit der Transmembrandomäne und dem katalytisch aktiven Teil des Proteins liegt (A). Die Vorhersage der Transmembrandomäne erfolgte u.a. über den TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (B).

Vor Durchführung der N-terminalen Modifikationen wurde ebenfalls versucht *echP450* im unmodifizierten, nativen Zustand heterolog zu exprimieren. Dazu wurde das Gen von *A. ruber* QEN-0407-G2 cDNA mit den Primern prJN023 und prJN024 intronfrei amplifiziert. pET28a(+) wurde mit NcoI und SmaI linearisiert und zusammen mit *echP450* dazu genutzt, *E. coli* XL10-Gold zu transformieren. Durch HR zwischen dem Vektor und den mit den Primern an *echP450* angehängten homologen Bereichen entstand das Expressionsplasmid pJN004 (Abbildung 84A), welches anschließend durch einen Restriktionsverdau mit SmaI und XbaI kontrolliert wurde (Erwartete Fragmente: 1647, 5192 bp). Die Sequenzintegrität von *echP450* wurde durch Sequenzierung bestätigt.

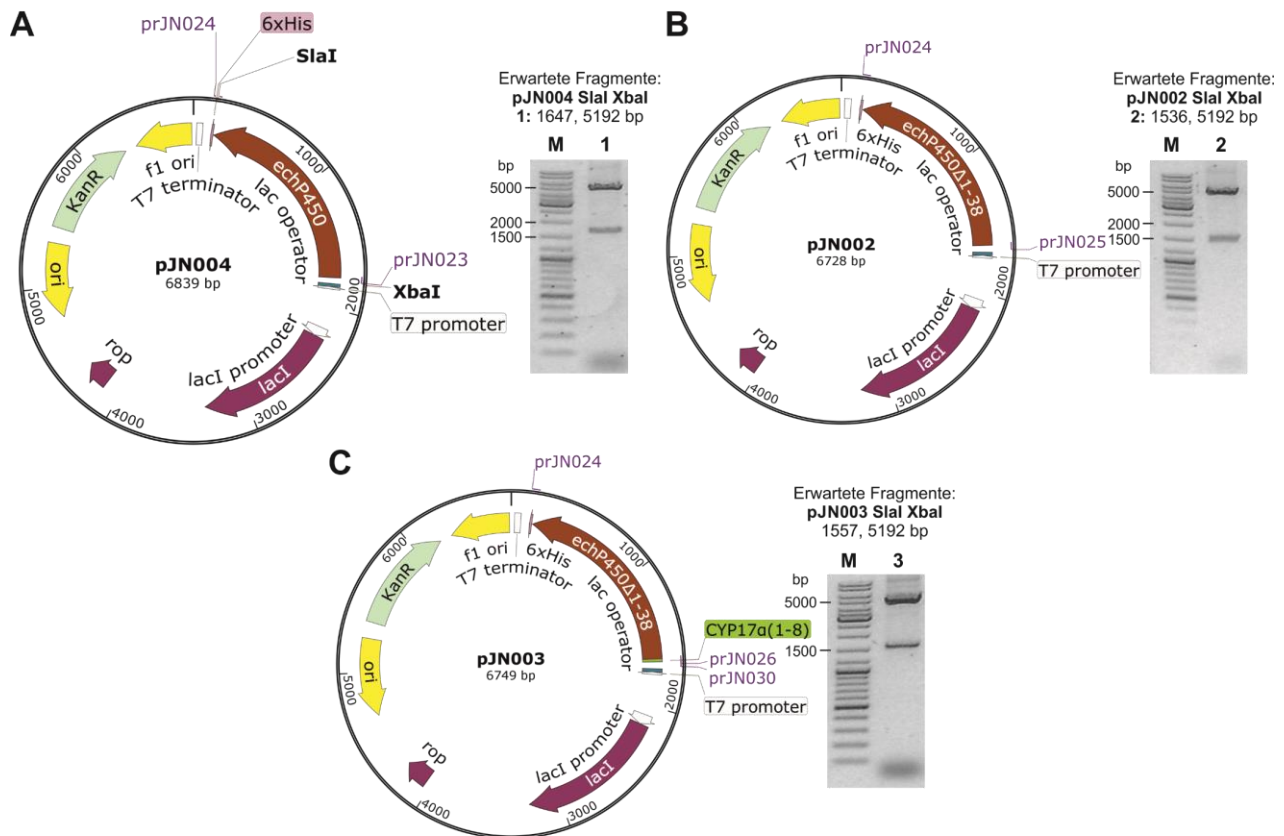


Abbildung 84: Plasmidkarten von pJN002 – pJN004 und Überprüfung der Vektoren via Restriktionsverdau

Plasmidkarte von pJN004 und Restriktionsverdau mit SmaI und XbaI (Erwartete Fragmente: 1647, 5192 bp) (A). Plasmidkarte von pJN002 und Restriktionsverdau mit SmaI und XbaI (Erwartete Fragmente: 1536, 5192 bp) (B). Plasmidkarte von pJN003 und Restriktionsverdau mit SmaI und XbaI (Erwartete Fragmente: 1557, 5192 bp) (C).

Die einfachste Modifikation bestand darin, EchP450 ohne seine Transmembrandomäne zu exprimieren. Dazu wurde das Gen ohne die Codons für die ersten 38 Aminosäuren mit den Primern prJN024 und prJN025 von *A. ruber* cDNA amplifiziert. Die Klonierung in pET28a(+) erfolgte wie oben beschrieben. Dabei entstand pJN002 (Abbildung 84B), das durch einen Verdau mit SmaI und XbaI überprüft wurde (Erwartete Fragmente: 1536, 5192 bp).

Für den Austausch der nativen Transmembrandomäne mit der Aminosäuresequenz MALLAFV des bovinen CYP17 α wurde echP450 mit den Primern prJN24 und prJN026 von *A. ruber* cDNA amplifiziert. prJN026 bindet auch erst nach dem Codon für Aminosäure 38 und führt die Sequenz für CYP17 α ₁₋₈ ein. Durch die begrenzte Primerlänge konnte mit prJN026 kein homologer Überhang für eine Klonierung mittels HR mehr angehängt werden, sodass das gereinigte PCR Fragment als Matritze für eine PCR mit den Primern prJN024 und prJN030 benutzt werden musste, um dieses Ziel zu erreichen. Die Klonierung mit dem NcoI-SmaI-linearisierten pET28a(+) erfolgte erneut über HR in *E. coli* XL10-Gold. Das Produkt dieser Klonierung war der Expressionsvektor pJN003 (Abbildung 84C). Dieser Vektor wurde durch eine Kontrollrestriktion mit SmaI und XbaI bestätigt (Erwartete Fragmente: 1557, 5192 bp).

Die bestehenden Expressionskonstrukte pJN002 – pJN004 wurden dazu benutzt, um optimale Expressionsbedingungen für *echP450* in *E. coli* zu finden. Dazu wurden *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS mit den Konstrukten pJN002, pJN003 und pJN004 (pET28a(+)-*echP450*_{Δ1-38}; pET28a(+)-CYP17α₁₋₈-*echP450*_{Δ1-38}; pET28a(+)-*echP450*_{WT}) transformiert und die Expression wurde in 50 ml LB bei 20°C, 30°C und 37°C getestet. Die Kulturen wurden bei einer OD₆₀₀ 0,6 mit 0,5 oder 1 mM IPTG induziert. Dabei wurden nach 0, 2, 4, 6 und 24 h Proben genommen und mittels SDS-PAGE auf die Überproduktion einer der EchP450-Varianten überprüft (Abbildung 85). Bei keiner der getesteten Bedingungen konnte eine signifikante Überproduktionsbande im Vergleich zur t₀-Probe beobachtet werden, auch schwache Banden mit korrektem Molekulargewicht wurden nach keinem der Zeitpunkte detektiert. In Abbildung 85 sind beispielhaft die Analysen der Testexpressionen in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS zu sehen, deren Induktion mit 1 mM IPTG stattfand.

In *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS:

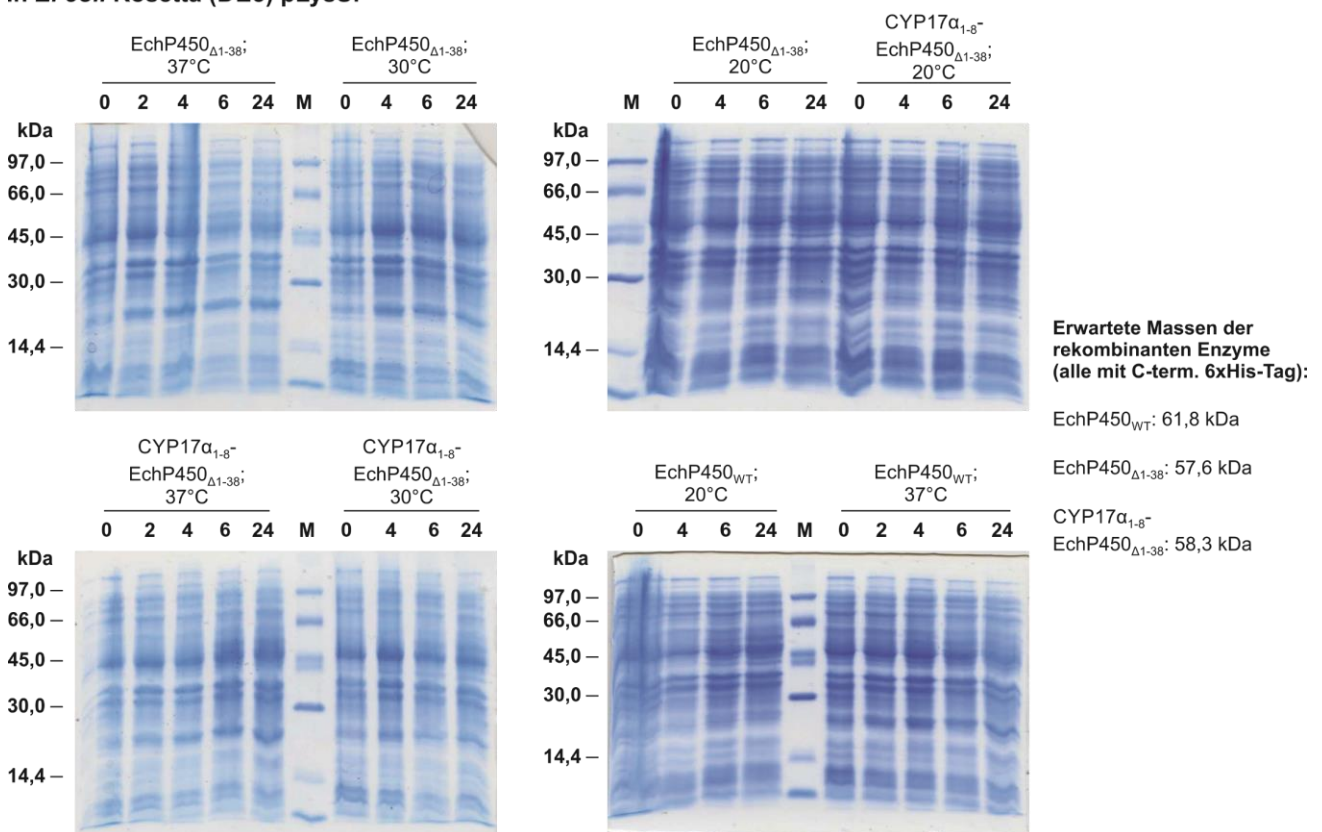


Abbildung 85: SDS-PAGE der Testexpression verschiedener EchP450-Modifikationen in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS
Unter keiner der getesteten Bedingungen konnten zusätzlichen Banden der passenden Masse entdeckt werden.

Eine Expression von EchP450_{WT} und der EchP450-Variante mit abgetrenntem Aminoterminus EchP450_{Δ1-38} wurde, wie in einigen Studien für pilzliche CYPs beschrieben, auch in *E. coli* BL21 (DE3) in 500 ml TB Medium durchgeführt.^{450,461,462} Dafür wurden die Hauptkulturen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 auf 37°C inkubiert und anschließend für 15 min auf Eis abgekühlt. Die Induktion erfolgte mit 0,5 mM IPTG und die Kulturen wurden 48 h bei 20°C inkubiert. Die gezogenen Proben wurden wieder über SDS-PAGE analysiert (Abbildung 86A).

Um potenziell schwach exprimiertes EchP450 vom Hintergrund diverser *E. coli*-Proteine abzutrennen wurden alle Kulturen der Testexpressionen einer Aufreinigung mit NiNTA-Agarose unterzogen. Neben verschiedenen unspezifisch gebundenen Wirtsproteinen konnten keine Banden der korrekten Masse beobachtet werden. Dazu ist in Abbildung 86B beispielhaft eine Analyse der Aufreinigung von potenziellem EchP450 $_{\Delta 1-38}$ aus *E. coli* BL21 (DE3) gezeigt.

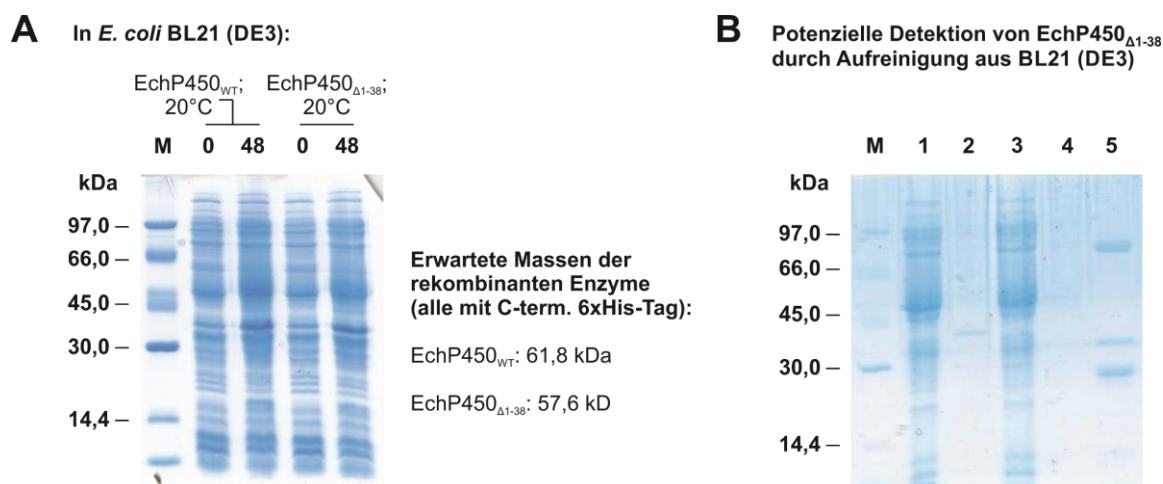


Abbildung 86: Analyse der Testexpression von EchP450-Konstrukten in *E. coli* BL21 (DE3) und testweise Reinigung via Affinitätschromatographie

Auch 48 h nach Induktion der Expression konnte für keines der Konstrukte eine neue Bande der erwarteten Größe detektiert werden (A). Die einzelnen Fraktionen der Aufreinigung von potenziell produziertem EchP450 $_{\Delta 1-38}$ zeigten keine Bande der erwarteten Masse (B): 1 löslicher Extrakt, 2 unlösliches Pellet, 3 Durchfluss, 4 Waschfraktion, 5 eluiertes Protein.

4.2.6.2 Heterologe Expression von *echP450* in *Saccharomyces cerevisiae*

Neben *E. coli* bot sich auch *S. cerevisiae* als praktikable Option für die Herstellung rekombinanter EchP450 an. Seit der ersten erfolgreichen Expression einer CYP in *S. cerevisiae* in 1985 hat diese Hefe eine lange Erfolgsgeschichte in Bezug auf die Produktion rekombinanter CYPs vorzuweisen.⁴⁶³ Dieser Organismus bietet gegenüber dem prokaryotischen *E. coli* den Vorteil subzellulärer Organellen, um die Funktion von membrangebundenen CYPs zu unterstützen, sodass der natürliche Membrananker nicht unbedingt modifiziert oder entfernt werden muss, um die Produktion des löslichen Enzyms zu gewährleisten.^{464–466} Die Funktionen vieler pilzlicher CYPs konnten so aufgeklärt oder nutzbar gemacht werden.^{467–473} Obwohl rekombinante CYPs membrangebunden in mikrosomalen Fraktionen aus der Hefe gewonnen werden können und damit durchführbare *in vitro*-Studien durch ihre Präzision einen Vorteil bieten, sind die Isolierung der Mikrosomen und Enzymassays mit ihnen aufgrund der damit verbundenen technischen Schwierigkeiten relativ kompliziert und anspruchsvoll.⁴⁷⁴ Im Vergleich dazu sind Biotransformationen mit intakten Zellen rekombinanter Hefe aufgrund ihrer Einfachheit und Enzymstabilität oft praktikabler.^{464,475} Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden schon erfolgreich Biotransformationen bzw. Fütterungsexperimente mit rekombinanter *S. cerevisiae* durchgeführt, die zum Beispiel FtmC (FtmP450-1) oder FtmE (FtmP450-2) aus der Fumitremorginbiosynthese von *N. fischeri* exprimierte (unveröffentlichte Daten). Über die Biotransformation durch *echP450*-

exprimierende *S. cerevisiae* sollte der Umsatz potenzieller Substrate beobachtet und damit die Reaktionsreihenfolge in der Echinulinbiosynthese aufgeklärt werden.

Das Gen *echP450* wurde mit den Primern prJN055 und prJN056 von *A. ruber* QEN-0407-G2 cDNA amplifiziert. Durch HR in *E. coli* wurde es mit dem NotI-EcoRI-linearisierten Vektor pPM13 zu dem Expressionsplasmid pJN013 kloniert (Abbildung 87A). pPM13 wurde von Herrn Dr. Peter Mai zur Verfügung gestellt und basiert auf dem *S. cerevisiae*-Expressionsvektor pESC-Ura. Unter der Kontrolle des bidirektionalen GAL1/GAL10-Promotors befindet sich auf pPM13 schon das Gen für die CPR *red1_SC* (NFIA_056739) aus *Neosartorya fischerii*, um eine Coexpression der CYP mit der CPR zu gewährleisten. pJN013 wurde durch einen Restriktionsverdau mit EcoRI und HindIII kontrolliert (Abbildung 87B; Erwartete Fragmente: 1078, 3206, 5988 bp). Die Stämme *S. cerevisiae* KO1 und BJ5465-npgA wurden mit pJN013 transformiert und die Anwesenheit des Plasmids in den Transformanten wurde durch eine Kolonie-PCR mit den Primern prJN023 und prJN024 bestätigt. (Abbildung 87C; Erwartetes Fragment: 1602 bp). Als Negativkontrolle wurden Kolonie-PCRs von Transformanten der Stämme KO1 und BJ5465-npgA mit dem Leervektor pPM13 durchgeführt (Erwartete Fragmente: keine). Für die Positivkontrolle diente das Plasmid pJN013 als Matritze (Erwartetes Fragment: 1602 bp).

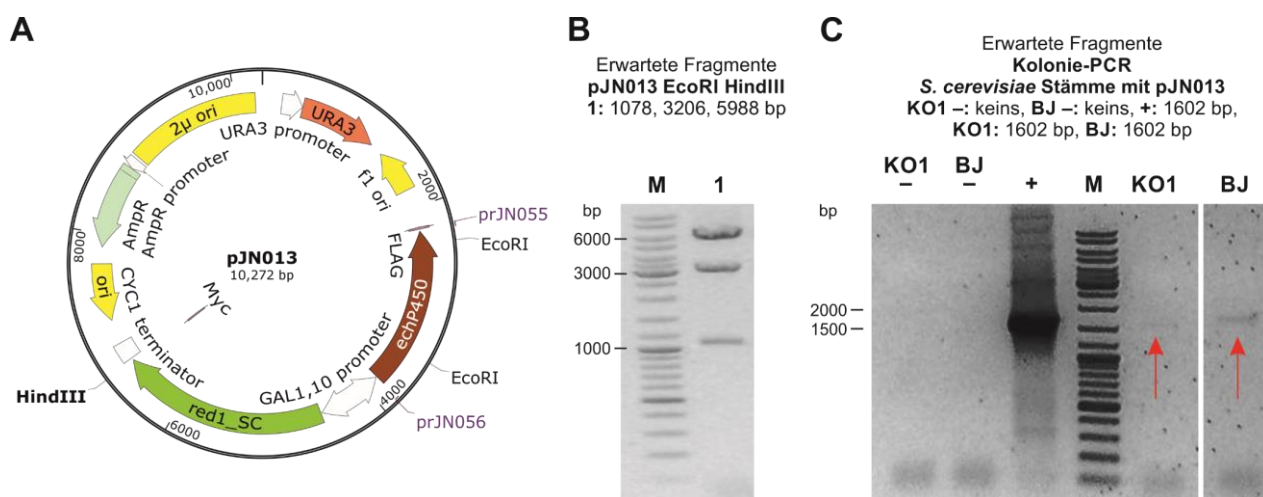


Abbildung 87 Kontrolle von pJN013 und den Expressionstämmen *S. cerevisiae* KO1 pJN013 bzw. BJ5465-npgA pJN013
Plasmidkarte von pJN013 (A). Restriktionsverdau von pJN013 mit EcoRI und HindIII (Erwartete Fragmente: 1078, 3206, 5988 bp) (B). Kolonie-PCR mit Transformanten der Stämme *S. cerevisiae* KO1 pJN013 und BJ5465-npgA pJN013 (Erwartetes Fragment bei positiven Transformanten: 1602 bp) (C).

Es wurden jeweils 5 ml SC-URA + 2 % (w/v) Glukose mit einem Klon des jeweiligen transformierten Stamms inokuliert und über Nacht bei 30°C schüttelnd mit 200 rpm inkubiert. 3 ml dieser Vorkultur wurden benutzt, um 500 ml SC-URA + 2 % (w/v) Galaktose anzuimpfen. Diese Kulturen wurden für 36 h bei 30°C schüttelnd mit 200 rpm inkubiert, bevor die Zellen in 100 ml YPD (Kohlenstoffquelle: Glukose) überführt und mit 0,04 mM cyclo-L-Trp-L-Ala (**15**) bzw. Preechinulin (**16**) versetzt wurden. Dieser Ansatz wurde für 14 Tage bei 30°C schüttelnd mit 200 rpm und regelmäßiger Probenentnahme inkubiert. Die Proben wurden mit Ethylacetat extrahiert, der Extrakt wurde eingeeengt, getrocknet, in Methanol aufgenommen und mittels LCMS analysiert. Es konnte kein Umsatz der potenziellen Substrate zu den erwarteten dehydrogenierten Produkten festgestellt werden (Abbildung 88).

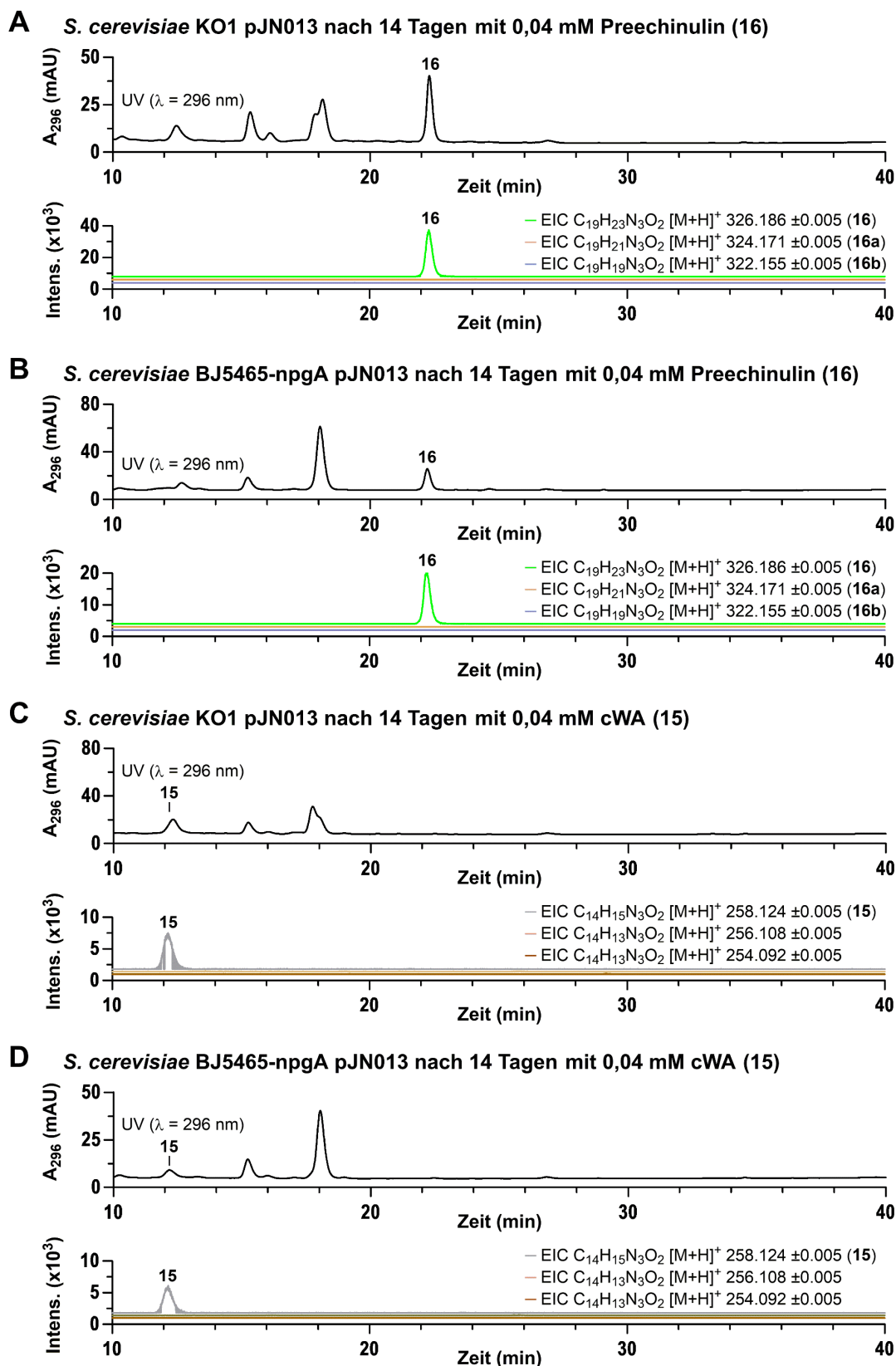


Abbildung 88: LC-MS Analyse des Extrakts der Biotransformationsexperimente mit *S. cerevisiae*

Die Biotransformationen wurden mit dem wahrscheinlichsten Substrat der EchP450 **16** und dem potenziell ebenso akzeptierten zyklischen Dipeptid **15** durchgeführt. Fütterung von **16** zu *S. cerevisiae* KO1 pJN013 (**A**). Fütterung von **16** zu *S. cerevisiae* BJ5465-npgA pJN013 (**B**). Fütterung von **15** zu *S. cerevisiae* KO1 pJN013 (**C**). Fütterung von **15** zu *S. cerevisiae* BJ5465-npgA pJN013 (**D**). Die getesteten Substrate wurden nicht umgesetzt.

4.2.6.3 Fütterungsexperimente mit dem *echP450*-Expressionsstamm *Aspergillus nidulans* JN042

Nachdem die Modifikation der *echP450*-Sequenzen nicht zu einer erfolgreichen Expression in *E. coli* führte und die Biotransformationen in *S. cerevisiae* ebenfalls erfolglos verliefen, sollte *echP450* wie zuvor *fogF* (Kapitel 4.1.7.2) in *A. nidulans* LO8030 unter der Kontrolle des starken konstitutiven *gpdA*-Promotors exprimiert und durch Fütterungsexperimente auf seine Funktion untersucht werden. Die Expression des *fog*-Clusters zeigte schon, dass *A. nidulans* prinzipiell in der Lage ist CYPs (konkret: *fogE*) aus *A. ruber* funktionell zu exprimieren, sodass auch für *echP450* eine gelungene Produktion wahrscheinlicher war als mit *E. coli* oder *S. cerevisiae*.

Das Gen *echP450* zusammen mit 500 bp stromabwärts des Stopcodons (enthalten den putativen natürlichen Terminator) wurde mit den Primern prJN311 und prJN312 von *A. ruber* QEN-0407-G2 gDNA amplifiziert. Durch homologe Rekombination in *E. coli* DH5 α wurde dieses Fragment mit SfoI-linearisiertem pJN017 zu dem Plasmid pJN068 kloniert (Abbildung 89A). Über einen Restriktionsverdau mit EcoRI wurde pJN068 auf seine Richtigkeit überprüft (Abbildung 89B; Erwartete Fragmente: 498, 1078, 2878, 6901 bp). Die Transformation von *A. nidulans* LO8030 Protoplasten mit pJN068 führte zum *echP450*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN042. Die Kontroll-PCR mit dem Primerpaar prJN311/312 (Abbildung 89C; Erwartetes Fragment: 2165 bp) zusammen mit dem weißen Phänotyp der Transformanten (Abbildung 89D) bestätigte die korrekte Integration der *echP450*-Expressionskassette am Locus des *wA*-PKS-Gens.

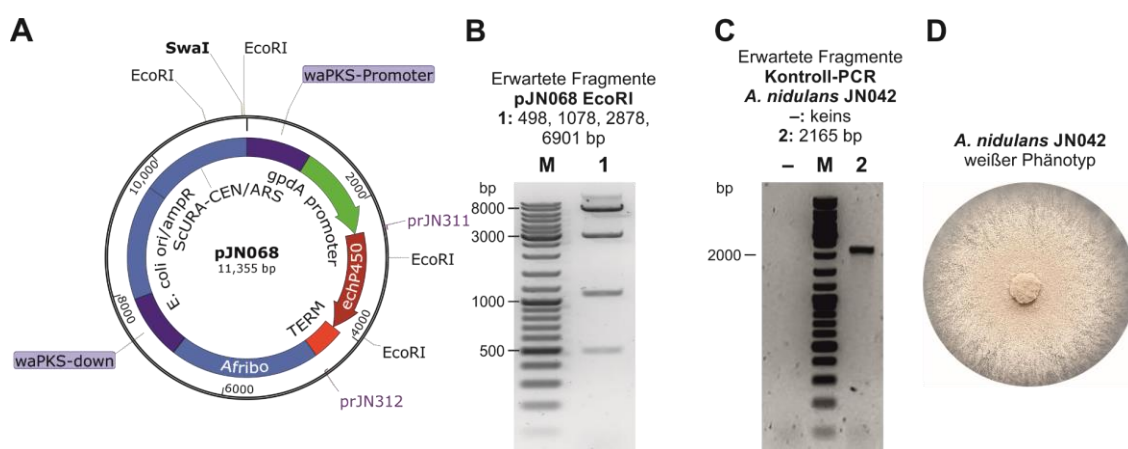


Abbildung 89: Kontrolle von pJN068 und dem *echP450*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN042

Plasmidkarte von pJN068 (A). Restriktionsverdau von pJN068 mit EcoRI zur Kontrolle (Erwartete Fragmente: 498, 1078, 2878, 6901 bp) (B). Kontroll-PCR zur Bestätigung der Anwesenheit von *echP450* (Erwartetes Fragment: 2165 bp) (C). Weißer Phänotyp des Stamms *A. nidulans* JN042 (D).

A. nidulans JN042 wurde in 5 ml PDB bei 25°C als Oberflächenkultur inkubiert. Nach der Inokulierung mit ca. 4×10^5 Sporen wurden der Kultur 50 μ M der in DMSO gelösten potenziellen Substrate Preechinulin (16) oder cyclo-L-Trp-L-Ala (15) zugegeben. Genauso wurde der Umsatz von Neoechinulin A (16a) getestet, um sicherzustellen, dass EchP450 wirklich nicht in der Lage ist die zweite Doppelbindung zwischen C14 und C17 einzuführen. Außerdem sollte beobachtet werden, ob Umsatz des schon

an C5 prenylierten Tardioxopiperazin **A** (**17**) stattfindet. Die kompletten Kulturen, bestehend aus Medium und Mycel, wurden nach 7 Tagen mit Ethylacetat extrahiert und ihr Extrakt wurde über LC-MS analysiert (Abbildung 90 und Abbildung 91).

Es wurde erwartet, dass das an C2 revers-prenylierte Preechinulin (**16**) das Substrat der EchP450 darstellt.¹¹⁸ In der Tat konnte nach der Zugabe von **16** ins Medium des Expressionsstamms JN042 Umsatz zu Neoechinulin A (**16a**) festgestellt werden (Abbildung 90Aii). Die Produktion von **16a** wurde auch durch das Signal im EIC bestätigt (Abbildung 90Aiv). Es war denkbar, dass EchP450 auch das unprenylierte zyklische Dipeptid akzeptiert. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde JN042 cyclo-L-Trp-L-Ala (**15**) zugefüttert. Hierbei konnte kein Umsatz zum erwarteten dehydrogenierten Produkt beobachtet werden (Abbildung 90Bii), was auch durch die Abwesenheit eines Signals im EIC bestätigt wurde (Abbildung 90Biv).

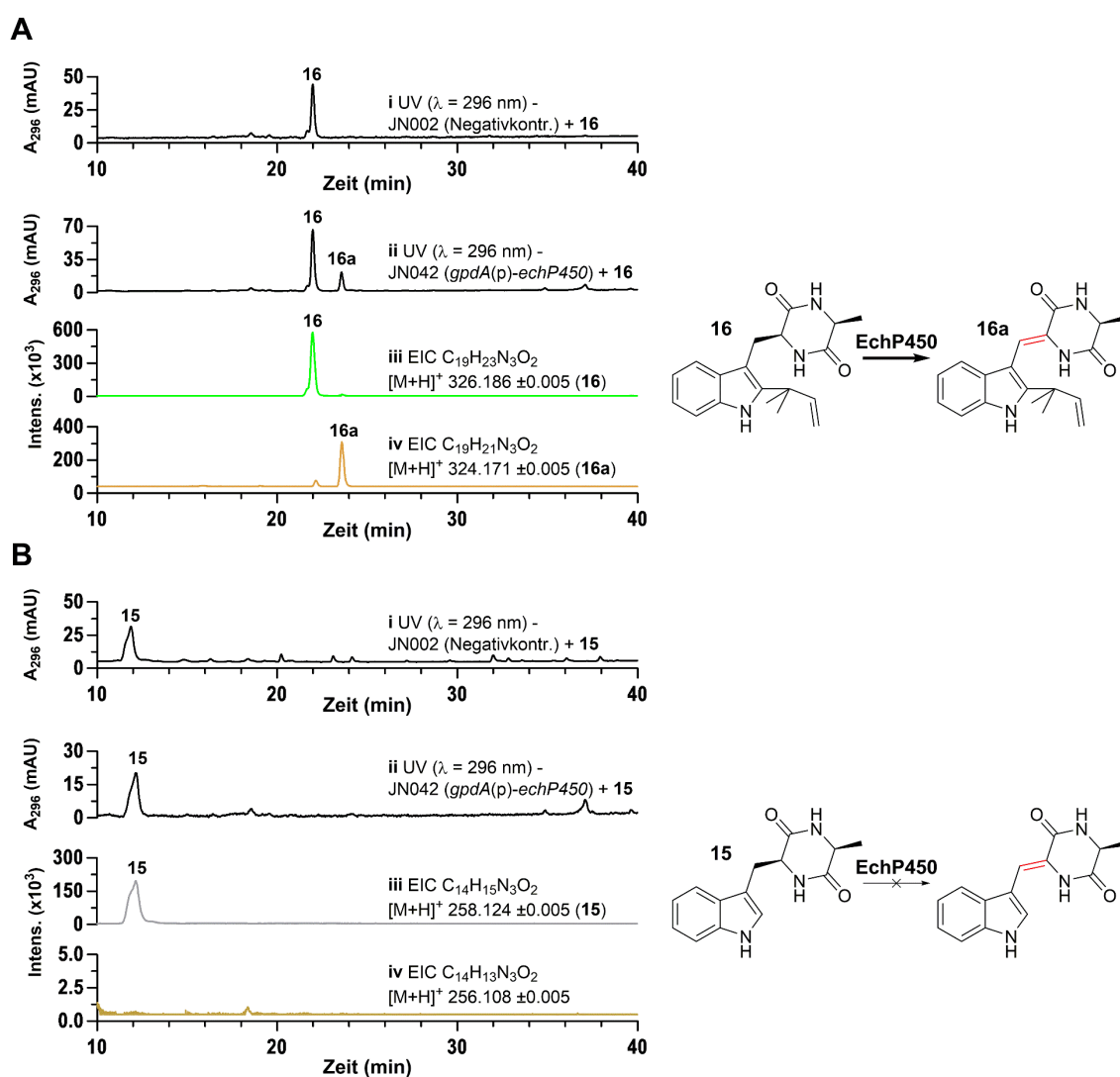


Abbildung 90: Fütterung von **16 und **15** zum *echP450*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN042**

Im Vergleich zur Negativkontrolle JN002 (**Ai**) konnte nach Zufüttern von Preechinulin (**16**) zum *echP450*-Expressionsstamm JN042 (**Aii**) Umsatz zu Neoechinulin A (**16a**) festgestellt werden. Auch im EIC für die Masse von **16a** war ein eindeutiges Signal zu erkennen (**Aiv**). cyclo-L-Trp-L-Ala (**15**) andererseits wurde durch EchP450 nicht zu seinem dehydrogenierten Produkt umgesetzt (**B**). Das wurde auch durch die Abwesenheit eines Signals im EIC für die Masse des dehydrogenierten Produkts (**Biv**) bestätigt.

Die Expression des *ech*-Clusters durch *A. nidulans* JN019 bzw JN044 deutete schon darauf hin, dass EchP450 nur eine Doppelbindung (Δ^{10}) installiert. Außerdem konnte nach dem Zufüttern von **16** nur Umsatz zu **16a** und keine Bildung von Neoechinulin B (**16b**) beobachtet werden. Zur eindeutigen Bestätigung dieser Hypothese wurde dem *echP450*-Expressionsstamm JN042 auch **16a** allein zugefüttert. Wie erwartet fand keine Konversion zu **16b** statt (Abbildung 91A). Die Zugabe des an C5 prenylierten Derivats von **16**, Tardioxopiperazin A (**17**), zu JN042 resultierte nicht in der Bildung des erwarteten dehydrogenierten Produkts Isoechinulin A (**17a**) (Abbildung 91B).

Zusammenfassend wurde durch EchP450 nur Preechinulin (**16**) zu Neoechinulin A (**16a**) umgesetzt, dabei stellte sich die von EchPT1 katalysierte reverse Prenylierung an C2 als essenziell heraus. Eine weitere Prenylierung am Indolring, katalysiert durch EchPT2, verhinderte weiteren Umsatz.

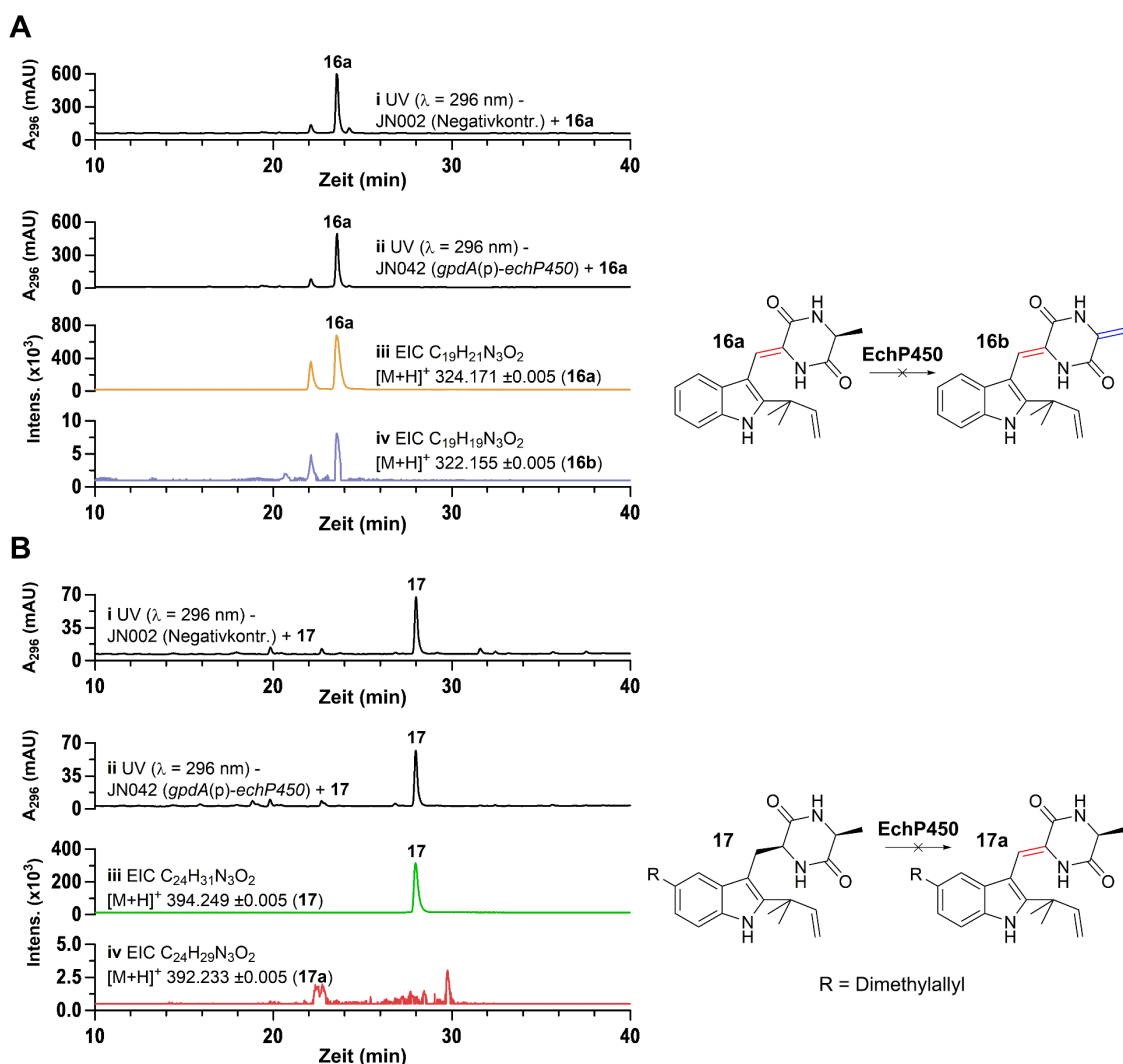


Abbildung 91: Fütterung von 16a und 17 zum *echP450*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN042

Die Zugabe von **16a** zum *A. nidulans* JN042 resultierte erwartungsgemäß nicht in der Bildung von **16b** (A). Auch das am Indolring prenylierte Tardioxopiperazin A (**17**) konnte von EchP450 nicht zu **17a** umgesetzt werden (B).

4.2.7 EchPT2 prenilyert bevorzugt Substrate der Echinulin-Serie

In einer vorherigen Studie wurde gezeigt, dass EchPT2 alle Metabolite der Echinulin-, Neoechinulin A- und Neoechinulin B-Serie für bis zu drei konsekutive Prenylierungsreaktionen akzeptiert.¹¹⁸ Wie in Kapitel 4.2.2 bzw. Abbildung 77 gezeigt wurde, akkumulierten hauptsächlich die Substanzen **16a**, **16b** und **19** als Alkaloide der Echinulin-Familie im Ursprungsorganismus *A. ruber* QEN-0407-G2. In dem Extrakt wurden viel mehr diprenylierte Produkte der Neoechinulin A- bzw. B-Serie (**17a**, **17b**, **18a** und **18b**) im Vergleich zu denen der Echinulin-Serie (nur **17**) detektiert. In den Expressionsstämmen *A. nidulans* JN019 und JN044 (Kapitel 4.2.3 und 4.2.5) wurden **16a** und **19** als Hauptprodukte festgestellt. Diprenylierte Metabolite der Neoechinulin A-Serie **17a** und **18a** akkumulierten in signifikant höherem Maße als die der Echinulin-Serie **17** oder **18**. All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass EchPT2 Substrate ohne Doppelbindung wesentlich effizienter für die regiospezifische Prenylierung nutzt als jene mit Doppelbindung. Außerdem scheint EchPT2 mit EchP450 um die Metabolisierung von Preechinulin (**16**) zu konkurrieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde EchPT2 in *E. coli* rekombinant produziert und in einem zeitabhängigen, kompetitiven *in vitro*-Assay mit den Substraten der Echinulin- (**16**) und der Neoechinulin A-Serie (**16a**) genutzt. Des Weiteren wurde die Substratkonzentration-abhängige Produktbildung durch EchPT2 beobachtet.

4.2.7.1 EchPT2-*in vitro*-Assay mit konkurrierenden Substraten

Die heterologe Expression von *echPT2* in *E. coli* erfolgte wie zuvor beschrieben.¹¹⁸ *E. coli* M15 wurden dafür mit dem Expressionsplasmid pVW83 (bereitgestellt von Frau Viola Wohlgemuth) transformiert und in einer 50 ml LB-Vorkultur über Nacht schüttelnd mit 230 rpm bei 37°C inkubiert. Aus dieser Vorkultur erfolgte die Inokulierung von 8 x 250 ml TB in 2 L Erlenmeyerkolben auf eine OD₆₀₀ von 0,2. Die Expression wurde nicht durch Zugabe von IPTG induziert, sondern verlief sich nur auf die Basalexpression des T5-Promotorsystems, um die Menge an unlöslichem Protein zu minimieren. Die Inkubation erfolgte bei 30°C schüttelnd mit 230 rpm für 24 h. Nach der Ernte der Kulturen wurden die Zellen aufgeschlossen und das rekombinante 6xHis-EchPT2 *via* Affinitätschromatographie an NiNTA-Agarose gereinigt.

Die kompetitiven *in vitro*-Assays wurden in einem 50 µl Reaktionsansatz durchgeführt. Dieser Ansatz enthielt 5 mM CaCl₂, 5 mM DMAPP, 0,5 – 5 % Glycerin, bis zu 5 % DMSO, 1 mM Preechinulin (**16**), 1 mM Neoechinulin A (**16a**) und 1 µg gereinigte rekombinante EchPT2 in 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Nach der Inkubation bei 37°C für bis zu 90 min wurden die Reaktionen durch Zugabe von 50 µl Methanol terminiert und über LC-MS analysiert (Abbildung 92).

Der kompetitive Assay zeigt, dass **16** durch die EchPT2 wesentlich besser umgesetzt wurde als **16a**. Das triprenylierte Produkt der Echinulin-Serie, Echinulin (**19**), konnte schon nach 5 min deutlich im UV-Chromatogramm detektiert werden (Abbildung 92ii). Die Produkte der Neoechinulin A-Serie wurden erst nach ca. 10 – 20 min eindeutig sichtbar (Abbildung 92iii und iv). Die Präferenz von EchPT2 gegenüber **16** war noch viel deutlicher in der Abnahme der Substrate erkennbar. Nach 90 min wurden über 90 % des Preechinulins (**16**) konsumiert, wohingegen noch 67% des Neoechinulin As (**16a**) vorlagen (Abbildung 92vii). Dabei wurde **16** hauptsächlich durch regiospezifische Prenylierung an C5 und

C7 zu **19** umgesetzt, mit einer nur geringen Akkumulierung von **18** als Nebenprodukt. Im Vergleich dazu wurde **16a** zu zwei diprenylierten (**17a** und **18a**) und zwei triprenylierten Produkten (**19a** und **20a**) konvertiert. Scheinbar ließ die Effizienz und die Regiospezifität der EchPT2-Reaktion in Anwesenheit der Doppelbindung Δ^{10} nach, was teilweise bereits in der zuvor zitierten Studie angedeutet und nun bestätigt werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich mit der beobachteten Ratio der akkumulierten Substanzen der Echinulin- und Neoechinulin A-Serie im ursprünglichen Produzenten *A. ruber*.

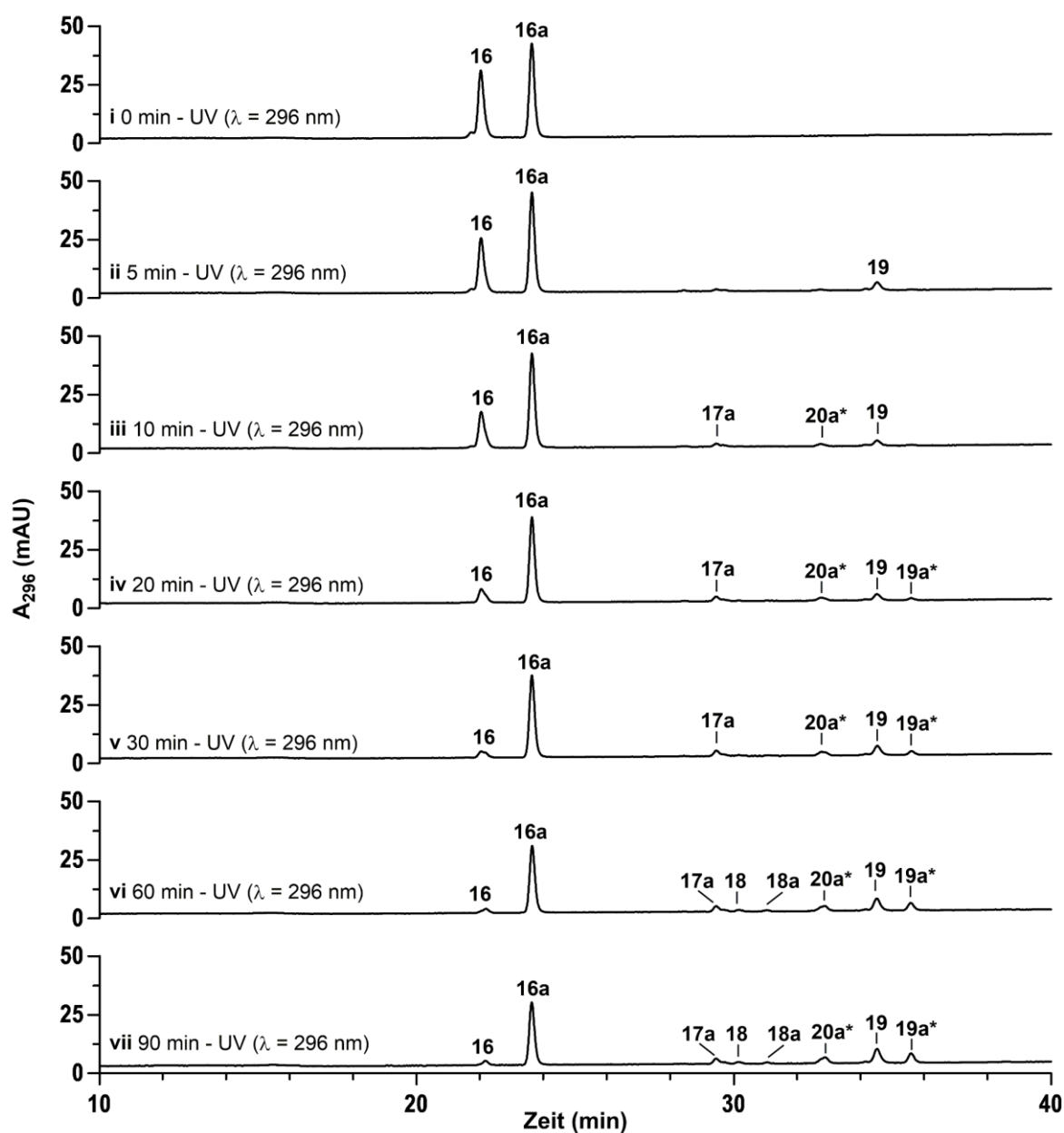


Abbildung 92: EchPT2-*in vitro*-Assay mit **16 und **16a** als kompetitive Substrate**

Die Assays wurden nach 0, 5, 10, 20, 30, 60 oder 90 min gestoppt. Nach 5 min (ii) konnte schon die Bildung von **19** beobachtet werden. Produkte der Neoechinulin A-Serie wurden erst nach 10 (iii) bis 20 min (iv) deutlich sichtbar. Nach 90 min (vii) waren über 90 % **16** umgesetzt, während noch 67 % **16a** vorhanden war.

4.2.7.2 Substratkonzentration-abhängige Produktbildung durch EchPT2

Zur genaueren Untersuchung der EchPT2-Substratpräferenz wurden *in vitro*-Assays mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substrate **16**, **16a** und **17a** durchgeführt. Die Assays wurden wie zuvor beschrieben in 50 µl Ansätzen durchgeführt. Sie enthielten 5 mM CaCl₂, 5 mM DMAPP, 0,5 – 5 % Glycerin, bis zu 5 % DMSO, 1 µg gereinigte rekombinante EchPT2 und die Substrate **16**, **16a** bzw. **17a** (Konzentrationen: 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 4 mM) in 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 50 µl Methanol gestoppt und über HPLC analysiert. Da sich die Elutionsmethode für die HPLC zu der der LC-MS unterscheidet, wurden zuvor die Substrate **16**, **16a**, **17a** und das Hauptprodukt der EchPT2 **19** als Standard und zur Quantifizierung analysiert (Anhang 3). Das triprenylierte Produkt von Neoechinulin A (höchstwahrscheinlich **19a**) wurde zuvor nicht isoliert und stand nicht als Standard zur Verfügung, sodass die Quantifizierung über die Menge des verbrauchten Substrates erfolgte.

Wie in Abbildung 93Ai-iii gezeigt, ist in Assays mit Preechinulin (**16**) als Substrat das triprenylierte Echinulin (**19**) das Hauptprodukt von EchPT2, ohne dass eine signifikante Menge des diprenylierten Tardioxopiperazin A (**17**) gebildet wird. Offensichtlich wird das Produkt der ersten Prenylierung an C5 (**17**) sofort in einer zweiten Prenylierungsreaktion an C7 zu **19** umgesetzt. Die kinetischen Parameter für das Substrat **16** konnten aufgrund dieser zwei konsekutiven Reaktionen nicht genau bestimmt werden. Stattdessen wurde die Gesamtreaktion von **16** über **17** zu **19** betrachtet und die insignifikante Bildung des Nebenprodukts **18** vernachlässigt. Die Werte für V_{\max} und K_M wurden dadurch über das Ablesen der angepassten Kurve nur grob geschätzt und dienen nur als Richtwert, weshalb auch keine Angabe der Standardfehler erfolgt. Durch die Auftragung der initialen Geschwindigkeit der Bildung von **19** gegen die Substratkonzentration war erkennbar, dass hier ab einer Konzentration von 1 mM **16** eine Substratinhibition auftrat (Abbildung 93Aiv). Die geschätzte maximale Geschwindigkeit V_{\max} für beide Prenylierungen von **16** zu **19** über **17** betrug 356 nmol min⁻¹ mg⁻¹ mit einer geschätzten halbmaximalen Substratkonzentration von 0,084 mM.

Wurde **16a** als Substrat verwendet, konnte sowohl die Bildung des diprenylierten Isoechinulin A (**17a**), als auch des triprenylierten Produkts (höchstwahrscheinlich **19a**) beobachtet werden (Abbildung 93Bi-iii). Mit steigender Substratkonzentration stieg die Geschwindigkeit der Bildung von **17a** leicht und glich annähernd einer Michaelis-Menten-Kinetik, während die von **19a** über 0,2 mM fast konstant blieb (Abbildung 93Biv).

Wie auch beim Umsatz von Preechinulin (**16**) wurde das Produkt der ersten Prenylierung von **16a**, Isoechinulin A (**17a**), von EchPT2 erneut als Substrat für eine zweite Prenylierung benutzt, sodass auch hier die Bestimmung der kinetischen Parameter nicht exakt erfolgen konnte. Die geschätzte V_{\max} für beide Prenylierungen betrug mit 86,9 nmol min⁻¹ mg⁻¹ nur 24 % der Maximalgeschwindigkeit des Preechinulin (**16**)-Umsatzes. Die halbmaximale Substratkonzentration dagegen war mit 0,15 mM ca. 1,8-mal so hoch.

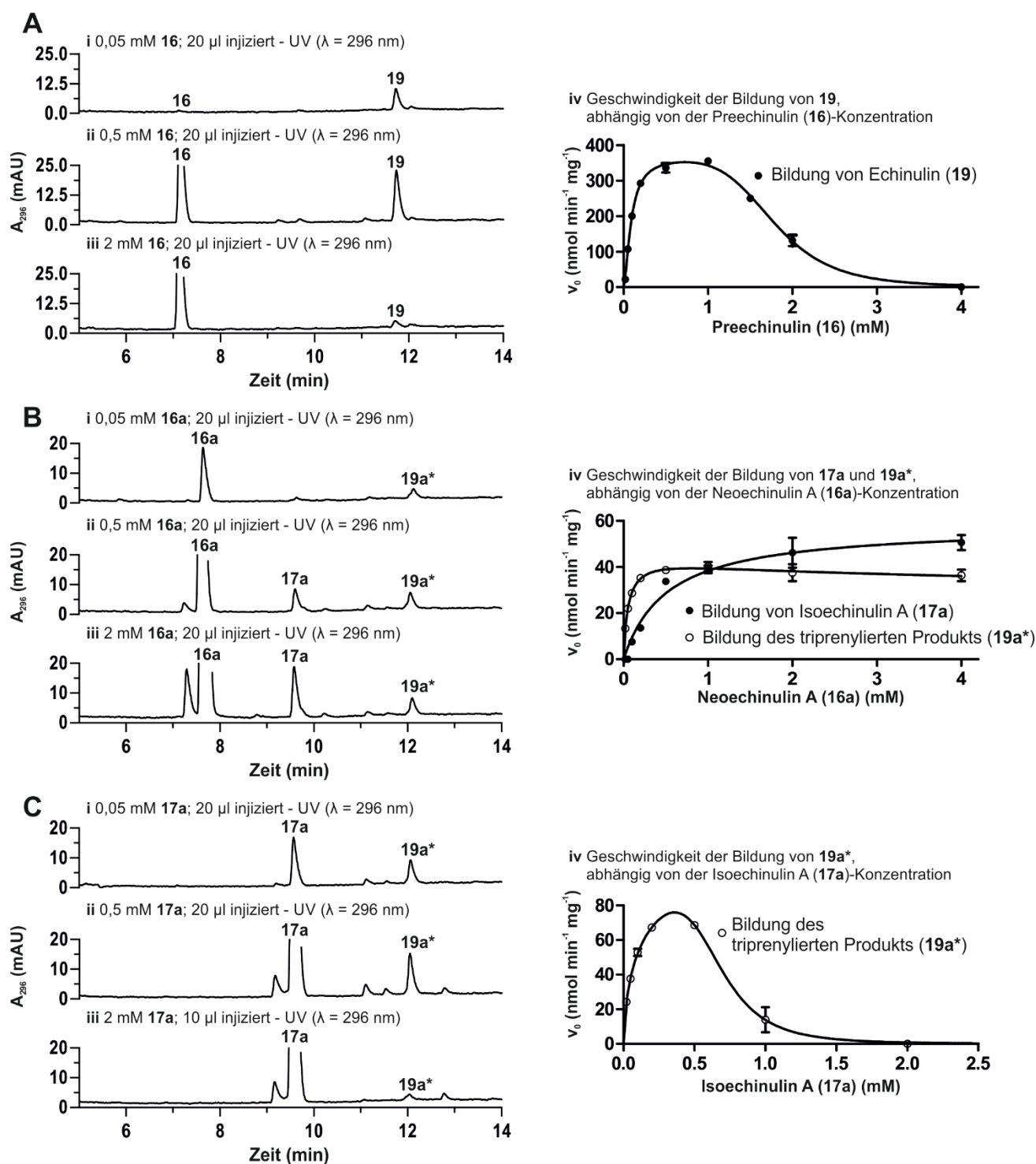


Abbildung 93: HPLC-Analyse substratkonzentration-abhängiger EchPT2-Assays und Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration

Abgebildet werden HPLC-Analysen der EchPT2-Assays mit einer Substratkonzentration aus dem niedrigen, mittleren und hohen Bereich, um die unterschiedliche Bildung der di- oder triprenylierten Produkte **17a** und **19a*** zu verdeutlichen. Daneben sind die anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeiten abhängig von der initialen Konzentration des jeweiligen Substrats aufgetragen. Die Daten dafür wurden aus mindestens drei unabhängigen Messungen gewonnen und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. EchPT2-Assay mit unterschiedlicher Konzentration des Substrats **16** (A). EchPT2-Assay mit unterschiedlicher Konzentration des Substrats **16a** (B). EchPT2-Assay mit unterschiedlicher Konzentration des Substrats **17a** (C).

Wenn das diprenylierte **17a** allein als Substrat für EchPT2 benutzt wurde, wurde das triprenylierte Derivat **19a** als Hauptprodukt gebildet (Abbildung 93Ci-iii). Ab einer Substratkonzentration von 0,5 mM oder höher wurde wieder eine Hemmung der Reaktion beobachtet (Abbildung 93iv). Die abgelesene Maximalgeschwindigkeit und halbmaximale Substratkonzentration betrugen jeweils $76,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und 0,081 mM. Scheinbar wird die Enzymaktivität eher durch das diprenylierte **17a** gehemmt als durch das monoprenylierte **16a**. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Inkubation von EchPT2 mit **16**, **16a** und **17a** in verschiedenen Konzentrationen die Substratpräferenz gegenüber Preechinulin (**16**) bestätigt.

5 Diskussion

5.1 Untersuchungen zur Flavoglaucinbiosynthese

5.1.1 Flavoglaucinanaloga in *Aspergillus ruber* QEN-0407-G2 und die heterologe Expression des *fog*-Clusters in *Aspergillus nidulans* LO8030

Alle drei getesteten Pilze *A. ruber* QEN-0407-G2, *A. cristatus* CGMCC 3.6083 und *A. glaucus* NRRL 116 sind in der Lage Substanzen der Flavoglaucin-Familie zu produzieren (Kapitel 4.1.1). Es konnte festgestellt werden, dass in *A. ruber* und *A. glaucus* die Menge der Substanzen mit steigender Anzahl an Doppelbindungen sinkt und Flavoglaucin (**1a**) mit seiner komplett gesättigten Heptylseitenkette das Hauptprodukt darstellt. *A. cristatus* jedoch produziert eine deutlich höhere Menge aller Substanzen unabhängig von der Anzahl und dem Muster der Doppelbindungen im Heptylrest. Die bisherigen Erkenntnisse der Flavoglaucinbiosynthese lassen noch nicht eindeutig darauf schließen, wodurch die Einführung der Doppelbindungen gesteuert wird, sodass keine genaue Aussage bezüglich der unterschiedlichen Verhältnisse an Flavoglaucinanaloga in *A. ruber* und *A. cristatus* oder dem kompletten Fehlen von **1g** möglich ist. Die höhere Ausbeute der Salicylaldehyde in *A. cristatus* könnte möglicherweise auf höhere Expressionslevel der *fog*-Gene oder eine höhere Verfügbarkeit von Vorstufen wie Acetyl-CoA oder Malonyl-CoA zurückzuführen sein.

Trotz der geringeren Produktion der Flavoglaucinanaloga wurde *A. ruber* QEN-0407-G2 aus mehreren Gründen zur Untersuchung des *fog*-Clusters ausgewählt. Erstens waren zum Zeitpunkt der Arbeitsaufnahme für dieses Projekt die *A. cristatus* oder *A. glaucus* Stämme noch nicht im Besitz der Arbeitsgruppe, zweitens wurden die kompletten bioinformatischen Analysen des *fog*-Clusters mit den Genomdaten von *A. ruber* ausgeführt und basierend darauf schon Primer für Gendelektionen designt und drittens wurden in unserer Gruppe schon zuvor Untersuchungen mit *A. ruber* durchgeführt, sodass ein gewisser Erfahrungswert mit diesem Organismus gegeben war. Nichtsdestotrotz konnte *A. ruber* nicht erfolgreich genetisch modifiziert werden. Auch durch Anwendung der Split-Marker-Methode zur Deletion von Genen in Organismen, deren Fähigkeit zur nicht-homologen Endverknüpfung nicht deaktiviert wurde, konnte kein Erfolg erzielt werden (Kapitel 4.1.3). Erwartungsgemäß war die Gesamtanzahl an Transformanten mit der Split-Marker-Methode sehr gering, weil dadurch die zufällige Integration der Hygromycin B-Resistenzkassette ins Genom erschwert wurde. Dennoch ist diese Möglichkeit nicht komplett ausgeschlossen, was die negativen Transformanten von *A. ruber* nach Transformation mit pJN008 und pJN009 zeigten. Durch die Nutzung der Split-Marker-Methode nimmt die Frequenz der DNA-Reparatur durch homologe Rekombination an sich nicht zu, sodass sich nach dem Wegfallen des Großteils falsch-positiver Transformanten die Netto-Anzahl richtiger Klone nicht wirklich erhöht. Wie zuvor erwähnt ist die erfolgreiche gezielte Integration auch vom genomischen Locus, der Länge der homologen Bereiche und möglicherweise von der Trennung des Markergens an sich abhängig.^{417,423}

Durch die unterschiedliche Effizienz homologer Rekombination in verschiedenen Organismen ist es möglich, dass die genetische Modifikation von *A. cristatus* oder *A. glaucus* zur Untersuchung des *fog*-Clusters unter Einsatz der Split-Marker-Methode erfolgreich gewesen wäre. Alternative Methoden zur gezielten genetischen Modifikation wären z.B. der Einsatz des CRISPR/Cas9 Systems, wie es schon erfolgreich für andere Ascomyceten wie *P. chrysogenum*, *A. fumigatus* oder *A. niger* eingesetzt wurde oder die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation, durch die nicht nur ungezielte Integration möglich ist, sondern wodurch auch eine hohe homologe Rekombinationseffizienz erreicht werden kann.^{476–480} Stand April 2021 wurden noch keine Studien veröffentlicht, in denen eine erfolgreiche genetische Manipulation von *A. ruber* beschrieben wurde.

Die mangelnde genetische Manipulierbarkeit von *A. ruber* QEN-0407-G2 konnte durch die heterologe Expression des *fog*-Clusters in *A. nidulans* LO8030 umgangen werden (Kapitel 4.1.4). Dadurch war es möglich zu bestätigen, dass dieser für die Biosynthese von Flavoglaucin und seinen Analoga verantwortlich ist. Wie im ursprünglichen Produzenten wurden im *fog*-Clusterexpressionsstamm *A. nidulans* JN004 die Substanzen **1a** – **1f** und **1h** gebildet. **1g** konnte auch hier nicht beobachtet werden, doch im Gegensatz zu *A. ruber* wurde **1h** nur in Spuren gefunden. Über die Kontrolle der Einführung von Doppelbindungen in die Heptylseitenkette der Flavoglaucinanaloga ist noch immer wenig bekannt.

Die heterologe Expression kann in einigen Fällen zur Umsetzung von heterologen Enzymprodukten durch endogene Enzyme des Expressionsorganismus führen.^{431,481,482} Dies wird u.a. durch Ergebnisse einer Studie unterstrichen, in der die heterologe Expression des *fls*-Genclusters aus *Micromonospora rosaria* SCSIO N160 in vier verschiedenen Expressionsorganismen zu unterschiedlichen Produkten führte.⁴⁸³ Die Verstoffwechslung der Intermediate **6a** und **6b** in den *fogE*-Deletionsstämmen durch ein Enzym des Expressionsorganismus *A. nidulans* wurde auch während dieser Arbeit beobachtet (Kapitel 4.1.5.4 und 4.1.6.1). Darüber hinaus können regulatorische Elemente des Wirtsorganismus Auswirkungen auf die Produktion von exogenen Produkten haben.¹⁹¹ Möglicherweise beeinflusst eine wirtseigene Reduktase das Muster der Doppelbindungen in der Heptylseitenkette, sodass ausgerechnet das Sättigungsmuster von **1h** in *A. nidulans* nicht bestehen bleibt.

5.1.2 Identifikation von *fog*-Cluster Homologen in anderen Organismen

Erwartungsgemäß konnten in den bisher verfügbaren genomischen Daten von Pilzen der *A. glaucus*-Gruppe Homologe des *fog*-Clusters aus *A. ruber* identifiziert werden (Abbildung 33). Besonders interessant im Hinblick auf die Detektion eines analogen BGCs ist die Isolierung von Flavoglaucinanaloga aus phylogenetisch weiter entfernten Organismen wie *Penicillium charlesii* oder sogar aus dem Actinobakterium *Streptomyces atrovirens* PK288-21.^{93,94} Aufgrund fehlender Daten konnten die Genome dieser Organismen noch nicht bioinformatisch auf die Anwesenheit eines homologen Clusters untersucht werden. Die Entdeckung eines ähnlichen Genclusters in *S. atrovirens* wäre allerdings überraschend. Ein horizontaler Gentransfer zwischen Vorfahren von *S. atrovirens* und Pilzen der *A. glaucus*-Gruppe wäre eine mögliche Erklärung für das Vorfinden von Flavoglaucinanaloga in solch unterschiedlichen Organismen. Es ist bekannt, dass horizontaler Gentransfer nicht nur innerhalb der Domänen Bacteria und Fungi stattfindet, sondern auch zwischen Bakterien und Pilzen.^{484–486} Dagegen

spricht allerdings, dass bisher nur einzelne Gene oder kurze Genabschnitte aus Prokaryoten eindeutig in Pilzen identifiziert wurden. Darüber hinaus wurde **1f** in *S. atrovirens* PK288-21 als einziges Flavoglaucinanalog isoliert und bisher wurden auch in keinen weiteren Streptomyceten ähnliche Substanzen gefunden, was die Wahrscheinlichkeit ein nahes Homolog des *fog*-Clusters in seinem Genom vorzufinden enorm verringert.

Die Beteiligung einer HR-PKS wurde auch für die Biosynthese des alkylierten Salicylaldehyds Pyriculol in *Magnaporthe oryzae* berichtet.⁴⁸⁷ Später wurde ein homologer (*srd*-) Cluster für die Biosynthese des Pyriculol-ähnlichen Sordarial entdeckt.⁴⁸⁸ Erst kurz vor der Beendigung der Arbeiten zur Flavoglaucinbiosynthese im Rahmen dieser Dissertation wurde die Funktion des (*vir*-) Clusters aus *Trichoderma virens* durch heterologe Expression in *A. nidulans* A1145 aufgeklärt. Dieser Gencluster ist für die Produktion des Epoxycyclohexenols Trichoxid über eine Salicylaldehydvorstufe verantwortlich und offenbart mit 7 homologen Genen eine große Ähnlichkeit zum *fog*-Cluster.²⁴⁴ Die Identität zwischen den homologen Proteinen, kodiert durch die *srd*-, *vir*- und *fog*-Cluster, beträgt größtenteils über 40%. Dabei sind Homologe zur HR-PKS FogA (SrdA, VirA), den kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen FogB (SrdC, VirB), FogD (SrdE, VirD) und FogG (VirG), sowie dem Cupin FogC (SrdD, VirC) und dem Cytochrom P450 Enzym FogE (VirE) zu finden (Abbildung 94). Im Kontext der aus diesen Studien gewonnenen Daten können u.U. weitere Rückschlüsse auf die Flavoglaucinbiosynthese gezogen werden, besonders im Hinblick auf die Bildung des ersten aromatischen Intermediaten. Darüber hinaus werden im weiteren Verlauf dieser Diskussion neben den Ähnlichkeiten auch die Unterschiede der Produktion von Flavoglaucin zur Sordarial- bzw. Trichoxidbiosynthese herausgearbeitet.

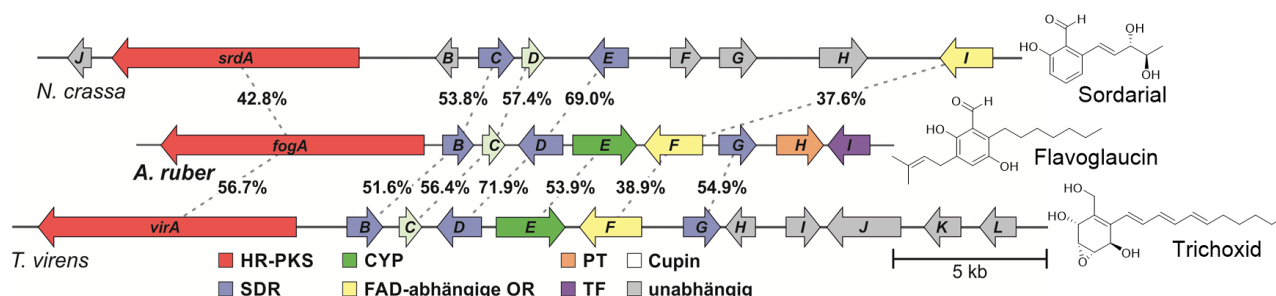


Abbildung 94: Vergleich des *fog*-Clusters aus *A. ruber* mit dem *srd*-Cluster in *N. crassa* und dem *vir*-Cluster in *T. virens*
Die Wiedergabe der Identität in Prozent bezieht sich auf die Aminosäuresequenz der kodierten Proteine

5.1.3 Biosynthese des ersten aromatischen Intermediaten

Typischerweise synthetisieren HR-PKS hoch-reduzierte Produkte, während partiell- oder nicht-reduzierende PKS Substanzen mit phenolhaltigen Gruppen wie z.B. 2,4-Dihydroxybenzol oder Salicylsäure produzieren können.⁴⁸⁹ Einer unserer früheren Hypothesen zu Folge konnte angenommen werden, dass zur Flavoglaucinbiosynthese eine HR-PKS ein Polyketid aus drei Ketideinheiten partiell oder vollständig reduziert, welches als Startereinheit für eine separate NR-PKS dient. Diese NR-PKS erweitert das Polyketid um vier weitere Ketideinheiten bevor durch ihre Produkttemplat (PT)-Domäne die C2-C7-Zyklisierung und die Bildung des Aromaten veranlasst wird. In ähnlicher Art und Weise werden Asperfuranon, Chaetoviridin und Resorcylsäure-Lactone wie Lasiodyplidin, Hypothemycin, Radicol

oder Zearalenon gebildet.^{170,215,241,243,490–492} Daher kam die vollständige Bildung der Flavoglaucinanaloga durch den *fog*-Cluster mit nur einer kodierten HR-PKS FogA, wie durch die Expression des Clusters in *A. nidulans* bestätigt wurde, überraschend. Die parallel untersuchten Cluster der Pyriculol-, Sordarial- und Trichoxidbiosynthese zeigten, dass dies kein Einzelfall war und in verschiedenen Ascomyceten alkylierte Salicylaldehyde in einer ähnlichen Art und Weise produziert werden.

Die Überexpression der HR-PKS FogA in *A. nidulans* LO8030 führte nicht zu einem zyklisierten, aromatischen Produkt sondern resultierte in der Bildung der offenkettigen (8*E*,10*E*,12*E*)-3,5,7-Trihydroxytetradeca-8,10,12-Triensäure (**2d**), die spontan unter Wasserelimination zu **3d** oder **5d** lactonierte bzw. ein Tetrahydropyran (**4d**) ausbildete (Kapitel 4.1.5.1). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, die bei der heterologen Expression von *virA* in *A. nidulans* A1145 gemacht wurde und auch dort die Notwendigkeit weiterer Enzyme zur korrekten Zyklisierung impliziert. Das Produkt von VirA (8*E*,10*E*,12*E*)-3,5,7-Trihydroxyoctadeca-8,10,12-Trienal, das in Lösung durch Ring-Ketten-Tautomerie hauptsächlich als ein Paar von Hemiacetalen vorlag, wurde allerdings unabhängig von weiteren Enzymen schon als Aldehyd von der PKS freigesetzt.²⁴⁴ VirA weist die gleiche Domänenarchitektur auf wie FogA und besitzt keine explizite Reduktasedomäne die diesen Schritt ermöglichen sollte. Allerdings konnte beobachtet werden, dass die Produktausbeute in Koexpression mit dem Cupin VirC (FogC-Homolog) deutlich erhöht ist, was bei der Trichoxidbiosynthese zumindest auf eine enge Kooperation weiterer Enzyme mit der PKS hinweist.

Die Deletion von *fogB*, *fogC* oder *fogD* in *A. nidulans* JN004 führte dazu, dass Flavoglaucin oder seine Analoga nicht mehr im UV-Chromatogramm der Extrakte detektiert werden konnten (Kapitel 4.1.5.3). Auch Intermediate der Flavoglaucinbiosynthese wurden in diesen Stämmen nicht gefunden. Offensichtlich werden alle drei Proteine benötigt, um zusammen mit FogA ein erstes korrekt zyklisiertes und aromatisches Intermediat zu bilden. Diese Annahme wurde durch die Koexpression von *fogA* mit *fogB*, *fogC*, *fogD* und *fogl* im Stamm *A. nidulans* JN029 bestätigt, wobei FogI als Transkriptionsfaktor keine biosynthetisch relevante Rolle einnimmt (Kapitel 4.1.5.5). Der besagte Stamm produzierte die 2-Alkyl-Salicylalkohole **6a** – **6d**. Diese Beobachtungen decken sich mit der Sordarialbiosynthese, bei der die Koexpression von SrdACD (FogABC-Homologe) in *A. nidulans* A1145 allein noch nicht zu einem Produkt führten. Erst nachdem auch SrdE (FogD-Homolog) mit anwesend war, konnte ein zyklisiertes, aromatisches Produkt isoliert werden.⁴⁸⁸ Im Gegensatz zur Überexpression von *fogA* wurden in den $\Delta fogB$ -, $\Delta fogC$ - und $\Delta fogD$ -Stämmen nur in der Masse geringe Mengen des offenkettigen Polyketids **2d** detektiert. In dem Überexpressionsstamm *A. nidulans* JN001 wurde die Transkription des Gens *fogA* vom starken konstitutiven *gpdA*-Promotor kontrolliert, der die Expression dauerhaft und nahezu unabhängig von den Umweltbedingungen gewährleistet.⁴⁹³ Alle *fog*-Gene im Clusterexpressionsstamm *A. nidulans* JN004 und seinen Deletionsmutanten stehen unter der Kontrolle ihrer nativen Promotoren aus *A. ruber*. Einerseits konnte der Cluster so einfacher kloniert werden, andererseits konnten durch Verwendung der nativen Promotoren auch die Auswirkungen des Transkriptionsfaktors FogI auf die Produktion von Flavoglaucin untersucht werden. Hier können die Expressionslevel dieser Gene durch Abhängigkeit von Transkriptionsfaktoren oder Umweltbedingungen geringer ausfallen. Außerdem ist es denkbar, dass *A. ruber*-Promotoren von der Transkriptionsmaschinerie in *A. nidulans* unterschiedlich stark angesprochen werden. Es ist daher nachvollziehbar,

dass der Überexpressionsstamm JN001 eine größere Menge des FogA-Produkts **2d** bildet als die *fogB*-, *fogC*- und *fogD*-Deletionsstämme. Ausgehend von der geringen Akkumulation des offenkettigen Polyketids **2d** in diesen Stämmen, der dennoch signifikanten Menge gebildeter Endprodukte im Clusterexpressionsstamm *A. nidulans* JN004 und dem Fakt, dass in den $\Delta fogB$ -, $\Delta fogC$ - und $\Delta fogD$ -Stämmen keinerlei Intermediate akkumulierten, kann postuliert werden, dass die Modifikation des naszenten Polyketids durch die zusätzlichen Enzyme FogB, FogC und FogD stattfinden, während es noch an FogA gebunden ist. Die Einwirkung von FogBCD auf das FogA-gebundene Polyketid resultiert in seiner korrekten Zyklisierung, Aromatisierung und reduktiven Freisetzung als Alkohol. Die offenkettige Carbonsäure **2d** scheint demnach ein Hydrolyseprodukt zu sein, welches aufgrund fehlender weiterer Modifikationen durch FogBCD nach einiger Zeit spontan vom ACP der PKS FogA abgespalten wurde.

Wie schon zuvor erwähnt zeigte die Analyse von FogB mit der NCBI *conserved domain database* Ähnlichkeit zu 3-Oxoacyl-ACP-Reduktasen, die in der Lage sind β -Ketoacyl-ACP zu β -Hydroxyacyl-ACP zu reduzieren.^{438,439} Es ist wahrscheinlich, dass verwandte Enzyme statt der Reduktion eines Ketons zu einem Alkohol stattdessen eine reverse Reaktion katalysieren. Durch Reoxidation des C7-Hydroxyls zu einem Keton wäre eine C2-C7-Zyklisierung des offenkettigen Polyketids möglich. Eine BLAST-Analyse von FogB ergab eine 69,34 %ige Identität (bei einem Query Cover von 100 %) zur 2-(*R*)-Hydroxypropyl-CoM-Dehydrogenase aus *Aspergillus saccharolyticus* JOP 1030-1, die in der Lage ist die Oxidation eines hydroxylierten Alkylthioesters zu einem Keton zu vermitteln. Dies macht FogB zu einem wahrscheinlichen Kandidaten für die Reoxidation einer Hydroxygruppe des FogA-gebundenen **2d**-Thioesters zum Keton. In der Tat wurde für das FogB-Homolog VirB in *in vitro*-Enzymassays gezeigt, dass dieses die Reoxidation der C7-Hydroxygruppe zum Keton katalysiert.²⁴⁴ In diesem Fall ist es VirB allerdings möglich unabhängig von der PKS VirA die freigesetzte offenkettige Carbonsäure als Substrat zu akzeptieren, was in Kontrast zu FogB steht, welches höchstwahrscheinlich das PKS-gebundene Polyketid reoxidiert. Es ist zu erwarten, dass die Zyklisierung der offenkettigen Vorstufe bei der Sordarialbiosynthese analog zur Produktion von Flavoglaucin abläuft, da die Ergebnisse der Koexpression von SrdA mit SrdCDE auch darauf hindeuten, dass die Modifikation des Polyketids in PKS-gebundener Form stattfindet.

Eine genaue Funktion für das Cupin-Domäne-enhaltende Protein FogC ist nicht vorherzusagen, da die Funktionen von Cupinen überaus vielzählig sind. Monocupin-Domänen können unter anderem in Dioxygenasen, Phosphomannose Isomerasen, Germin-ähnlichen Proteinen (hauptsächlich Oxalat-Oxidasen, Superoxid Dismutasen), Auxin-bindenden Proteinen (für die Signaltransduktion) oder auch nuklearen Proteinen enthalten sein.⁴⁴⁰ Die Deletion von *fogC* (Kapitel 4.1.5.3) und die Expression zusammen mit *fogA*, *fogB* und *fogD* (Kapitel 4.1.5.5) zeigten allerdings, dass es für die Herstellung des ersten Intermediaten in der Flavoglaucinbiosynthese essenziell ist. Genauso verhält es sich für sein Homolog SrdD bei der Produktion von Sordarial.⁴⁸⁸ In der Trichoxidbiosynthese scheint VirC jedoch nicht unbedingt notwendig zu sein, da die PKS VirA zusammen mit den SDRs VirB und VirD schon ein 2-Alkyl-Salicylaldehydprodukt synthetisieren kann.²⁴⁴ VirC beeinflusste die Produktion des offenkettigen Aldehyds durch VirA jedoch positiv, sodass über die Koexpression beider Gene in *A. nidulans* mehr Produkt gewonnen werden konnte als bei der Expression von *virA* allein.

Eine BLAST-Analyse identifizierte das nächste, zu FogD homologe, Enzym mit einer bekannten Funktion als 1-Acyl-Dihydroxyacetonphosphat-Reduktase aus *Fusarium fujikuroi* (70,0 %ige Identität bei einem Query-Cover von 98,0 %). Dieses Enzym ist aus der Produktion von Phosphatidsäuren bekannt und katalysiert dabei die Reduktion der Ketogruppe von 1-Acyl-Dihydroxyacetonphosphat zum 1-Acyl-Glycerin-3-Phosphat.⁴⁹⁴ Abermals kann angenommen werden, dass verwandte Enzyme auch in der Lage sind, reverse Reaktionen, also die Oxidation einer Hydroxygruppe zum Keton, zu katalysieren. Die Aromatisierung des Ringsystems der Flavoglaucinvorstufe könnte möglicherweise durch Reoxidation der C3- und spontaner Abspaltung der C5-Hydroxygruppe verlaufen. Es wäre plausibel, wenn FogD dafür die Reoxidation der C3-Hydroxygruppe katalysiert. Wie auch VirB wurde das FogD-Homolog VirD aus der Trichoxidbiosynthese in *in vitro*-Assays getestet. Dabei stellte sich heraus, dass VirD nicht nur die erwartete Reoxidation des C3-Hydroxyls, sondern auch die Reduktion des endständigen Aldehyds zu einem Alkohol katalysiert.²⁴⁴ Das bei der Oxidation der Hydroxygruppe entstehende NADH wurde als Reduktionsäquivalent für die Reduktion des Aldehyds zum Alkohol benutzt. Basierend auf diesen Ergebnissen ist FogD ein plausibler Kandidat für die Reoxidation des C3-Hydroxyls, sowie die reduktive Freisetzung des Polyketids als Alkohol in der Flavoglaucinbiosynthese.

Neben dem Fakt, dass die Flavoglaucinbiosynthese einer der wenigen Fälle darstellt, in dem eine HR-PKS an der Bildung eines phenolhaltigen Produkts beteiligt ist, wirft auch die reduktive Freisetzung des Polyketids mit Hilfe diskreter Oxidoreduktasen interessante Fragen bezüglich ihres Mechanismus auf. Typischerweise enthalten sowohl NR-, PR- als auch in seltenen Fällen HR-PKS eine Reduktase (R)-Domäne für die Reduktion des Acyl-Thioesters zu einem freien Aldehyd- bzw. Alkoholprodukt.^{217,230,495} Es ist auch bekannt, dass Arylsäuren als Produkte von NR-PKS von separaten NRPS-ähnlichen Enzymen mit einer A-ACP-R-Domänenstruktur aktiviert und zu einem Benzolcarbaldehyd reduziert werden.^{323,496} Die meisten HR-PKS besitzen wie FogA, VirA oder SrdA jedoch keine dedizierte Domäne für die Freisetzung der Polyketidkette und es sind nur begrenzte Informationen über ihre Freisetzungsmechanismen bekannt.²¹⁴ In der Flavoglaucinbiosynthese erfordert die Reduktion des Thioesters und die Freisetzung als Alkohol zwei diskrete 2-Elektron-Reduktionsschritte. Die Expression von VirA zeigte, dass die PKS allein in der Lage war, das Produkt in einer 2-Elektron-Reduktion als Aldehyd freizusetzen, bevor es später durch VirD weiter zu einem Alkohol reduziert wurde, welches dabei allerdings als vermeidbares Nebenprodukt von VirD betrachtet wurde.²⁴⁴ Das wirft die Frage auf, ob FogA durch Interaktion mit FogBCD möglicherweise auch in der Lage ist, die erste Reduktion zum Aldehyd zu katalysieren, bevor FogD in einer zweiten Reaktion das Aldehyd zum Alkohol reduziert. Andernfalls müsste hier FogD allein beide Reduktionen durchführen. Es sind Reduktasedomänen von NRPS bekannt, die 4-Elektron-Reduktionen (in zwei separaten Schritten) katalysieren können. Die Reduktasedomäne der NRPS LtxA aus *Lyngbya majuscula* z.B. gehört wie FogD zur kurzkettigen Dehydrogenase/Reduktase-Überfamilie und besitzt deren klassische Rossmann-Faltung zur Bindung von NAD,⁴⁹⁷ weist aber in einem paarweisen Alignment zu FogD (durchgeführt mit EMBOSS Needle) keine Ähnlichkeit auf dem Aminosäurelevel auf. Die Aufteilung der Reduktionsschritte auf FogA und FogD ist damit das plausiblere Szenario.

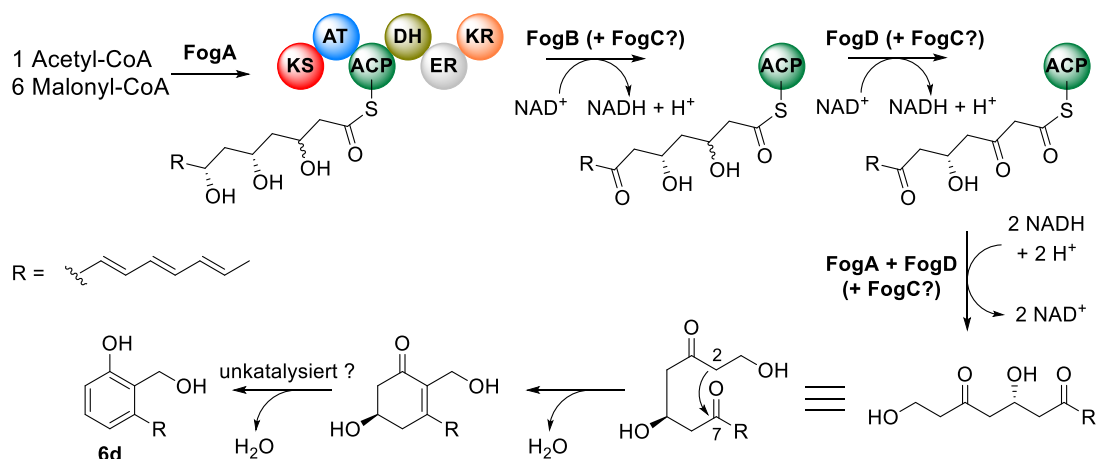


Abbildung 95: Postulierte Biosynthese des ersten aromatischen Intermediaten 6d

Die potenzielle Biosynthese des ersten aromatischen Intermediats wurde basierend auf den Erkenntnissen mit den FogABCD-Homologen VirABCD²⁴⁴ und den in dieser Arbeit gewonnenen Daten postuliert. Das Schema zeigt die Biosynthese des ersten aromatischen Intermediats am Beispiel von **6d** mit komplett ungesättigter Seitenkette, da noch unklar ist, wie die Sättigung der Seitenkette kontrolliert wird.

Die Flavoglaucinanaloga sind von den hier besprochenen Salicylaldehyden die einzigen, die ein variierendes Muster oder Anzahl an Doppelbindungen in der Alkylseitenkette aufweisen. Die in Kapitel 4.1.5.1 präsentierten Ergebnisse deuten darauf hin, dass FogA möglicherweise allein in der Lage ist zumindest geringe Mengen an Produkten mit unterschiedlicher Sättigung der Seitenkette herzustellen. Die Koexpression von FogA, FogB, FogC, FogD und FogI zeigt, dass die Menge an Produkten mit mehrfach gesättigter Seitenkette in Anwesenheit von FogBCD drastisch erhöht und die vollständige Reduktion zum komplett gesättigten Heptylrest überhaupt erst ermöglicht wird (Kapitel 4.1.5.5). Sollten FogB und FogD analoge Reaktionen zu ihren Homologen VirB und VirD katalysieren und FogC aufgrund mangelnder Bindestellen für reduktionsäquivalente Cosubstrate wie NADH oder NADPH als reduzierendes Enzym wegfallen, bliebe nur noch FogA selbst für die komplette Sättigung der Seitenkette.

Schon früher wurde gezeigt, dass sich die Effizienz bzw. die Aktivität von Enzymen durch Protein-Protein-Interaktionen verändern kann.^{498,499} Während die Interaktionen zwischen den Einzelproteinen modularer Typ I PKS schon umfangreich untersucht wurden^{500–502} ist bisher noch keine Veränderung der Aktivität durch Protein-Protein-Interaktionen zwischen iterativen Typ I PKS und anderen Enzymen bekannt. Möglicherweise induziert die Interaktion von FogB, FogC und/oder FogD mit FogA eine Konformationsänderung, die die inherente Programmierung von FogA dahingehend verändert, dass die ER während der Prozessierung der ersten drei Ketideinheiten vermehrt zum Einsatz kommt. Über die genaue Funktion von FogB, FogC und FogD in ihrer Interaktion mit FogA, die von ihnen ermöglichte Zyklisierung des Polyketids und die Kontrolle über die Sättigung der Seitenkette kann bisher basierend auf den Parallelen zur Trichoxidbiosynthese nur spekuliert werden und bedarf noch weiterer Untersuchung.

5.1.4 Hydroxylierung der 2-Alkyl-Salicylalkoholintermediate durch FogE

Die Deletion von *fogE* in *A. nidulans* JN004 führte zur Akkumulierung von **6a** – **6d**, den gleichen 2-Alkyl-Salicylalkoholen, die nach der Koexpression von FogABCDI beobachtet werden konnten (Kapitel 4.1.5.4 und 4.1.5.5). Das deutet darauf hin, dass das Cytochrom P450 Enzym FogE wie erwartet eine Monooxygenase-Funktion übernimmt und die C3-Hydroxlierung der Intermediate katalysiert. Dies stimmt mit der Funktion seines Homologes VirE überein, was durch eine vergleichbare Hydroxylierung Virensol B zu Virensol A umsetzt.²⁴⁴ Der *srd*-Cluster und der Cluster für die Pyriculolbiosynthese weisen keine Homologe zu *fogE* auf und ihre Produkte besitzen auch keine analoge Hydroxygruppe.^{487,488} Die Hydroxylierung der Intermediate **6a** und **6b** kann in der Deletionsmutante *A. nidulans* JN007 scheinbar teilweise durch ein endogenes Wirtsenzym ersetzt werden, was zur Bildung von **7a** und **7b** führt, die von den restlichen Enzymen des *fog*-Pathways zu den Endprodukten **1a** und **1b** weiter konvertiert werden. Das gleiche Phänomen wurde auch in den Stämmen *A. nidulans* JN020 und JN029 beobachtet, in denen *fogE* und jeweils zwei bzw. drei weitere Gene deletiert wurden. In diesen Stämmen fand allerdings kein weiterer Umsatz von **7a** und **7b** statt, weil die nächsten relevanten Enzyme des Stoffwechselwegs *fogH* und *fogF* fehlten. Eine BLAST-Analyse mit der Aminosäuresequenz von FogE gegen annotierte Proteine von *A. nidulans* offenbarte ein CYP, das diese Rolle möglicherweise erfüllt: die Aminosäuresequenz des Cytochrom P450 Enzyms AN8358.4 von *A. nidulans* weist eine 48,96 %ige Sequenzidentität mit einem Query-Cover von 97 % zu FogE aus *A. ruber* auf.

5.1.5 Spontane Oxidation der 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkoholintermediate zu Chinonen und *vice versa*

Die Produkte des CYP-Enzyms FogE **7a** bzw. der Prenyltransferase FogH **9a** waren in der Lage spontan von Hydrochinonen zu den Benzochinonen **8a** bzw. **10a** zu oxidieren (Kapitel 4.1.6.2). Es ist bekannt, dass die Autoxidation von Hydrochinonen mit Luftsauerstoff über ein Semichinonanion zur Chinonform führen kann. Dabei werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Hyperoxid-Anionen ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxyl-Radikale ($\bullet OH$) gebildet.^{503,504} Diese setzen Organismen unter enormen oxidativen Stress und können Zellbestandteile schädigen.⁵⁰⁵ **7a** und **9a** besitzen einen Hydrochinon (1,4-Dihydroxybenzol)-Kern und sind Derivate von Gentsylalkohol (2,5-Dihydroxybenzylalkohol). 1,4-Dihydroxybenzol und Gentsylalkohol wurden ROS-vermittelte oxidative Mutagenität nachgewiesen.^{506,507} Organismen haben diverse Schutzmechanismen entwickelt, die hauptsächlich darin bestehen, diese ROS enzymatisch zu detoxifizieren (z.B. durch Superoxid-Dismutasen und Katalasen).^{508,509} Es ist daher nicht verwunderlich, wenn Organismen, die solche reaktionsfreudigen Substanzen herstellen, Bedingungen schaffen, unter denen die Autoxidationsrate vermindert wird. In Extrakten der *fogH*-Deletionsmutante *A. nidulans* JN006 (Kapitel 4.1.6.1) und nach Zufüttern des prenylierten Hydrochinon-Benzylalkohols **9a** zu Pilzkulturen (Kapitel 4.1.7.2) wurde beobachtet, dass hauptsächlich die Hydrochinonform vorlag und die Autoxidation nur zu einer geringen Menge des Chinon-Benzylalkohols **10a** führte. Die durch den Pilz geschaffenen physiologischen Bedingungen schienen die Autoxidationsrate der Hydrochinone und damit auch die Bildung von schädlichen ROS niedrig zu halten. Die Autoxidationsrate von Hydrochinonen sinkt mit dem pH, kann aber durch An-

wesenheit seines Chinonprodukts oder redox-aktiver Metalle gesteigert werden.⁵¹⁰ Unglücklicherweise wurde der pH der Kulturen nicht verfolgt, um dies zu bestätigen. Es ist aber auch denkbar, dass der Autoxidation des Hydrochinons durch Reduktion des entstehenden Chinons mit einem *A. nidulans* Enzym wieder entgegengewirkt wurde. Dafür spräche auch die fast vollständige Umwandlung des Benzochinons **10a** zum Hydrochinon **9a**, nach Zugabe zur Pilzkultur. In den Medienkontrollen der gleichen Fütterungsexperimente lag, unabhängig von der Zugabe des Hydrochinons **9a** oder des Chinons **10a**, hauptsächlich die Chinonform vor. Die Stabilitätstests der Hydrochinone **7a** und **9a** in wässriger Lösung hingegen zeigten eine geringere Menge der oxidierten Produkte **8a** und **10a** (Kapitel 4.1.6.2). Es ist möglich, dass die Bedingungen im Medium ohne den Pilz eine Oxidation des Hydrochinons zum Chinon favorisierten. Der Unterschied zwischen der Mediumkontrolle und dem Stabilitätstest in Wasser ist damit zu erklären, dass die Stoffe im Rahmen der Fütterungsexperimente zum einen viel länger inkubiert wurden (4 Tage vs 4 h) und zum anderen, dass das benutzte Komplexmedium PDB (durch Zugabe der Spurenelementlösung) mit Sicherheit redox-aktive Übergangsmetalle wie Eisen, Kupfer oder Mangan enthielt, was die Autoxidationsrate von Hydrochinonen erhöht.^{511–516} Außerdem kann es sein, dass die unterschiedlichen Bedingungen das Reaktionsgleichgewicht entweder in Richtung des Hydrochinons oder des Chinons verschieben.

Unabhängig davon, ob die Autoxidation des Hydrochinons in Anwesenheit des Pilzes verlangsamt oder das entstandene Chinon durch ein Enzym wieder reduziert wird, konnte sowohl in wässriger Lösung als auch dem Medium beobachtet werden, dass die spontane Reduktion der Benzochinone **8a** und **10a** zu den Hydrochinonen **7a** und **9a** ebenso möglich ist. Dabei wurden aber neben den Hydrochinonformen der Benzylalkohole **7a** oder **9a** auch Hydrochinonmoleküle gebildet, deren Benzylalkoholfunktion zu einem Aldehyd oxidiert war (**11a** bzw. **1a**). Diese Produkte entstanden in einem ungefähr gleichen Verhältnis. Basierend auf diesen Daten kann postuliert werden, dass die Benzochinone **8a** und **10a** in einer Art Disproportionierung sowohl als Reduktions- als auch als Oxidationsmittel agieren können (Abbildung 96). Ein Molekül des Benzochinon-Alkohols (**8a** / **10a**) könnte ein anderes durch Aufnahme zweier Elektronen zu einem intermediären Benzochinon-Aldehyd oxidieren, während es selbst zum Hydrochinon-Benzylalkohol (**7a** / **9a**) reduziert wird. Der intermediäre Aldehyd wird durch Aufnahme zwei weiterer Elektronen von einem anderen Benzochinon-Alkohol zu einem stabilen Hydrochinon-Benzaldehyd (**11a** / **1a**) oxidiert. Dabei entsteht ein weiteres Molekül des Intermediats, das mit einem weiteren Benzochinon-Alkohol weiter reagieren kann. Durch diese Selbstkatalyse entstünden theoretisch gleiche Mengen der Hydrochinon-Benzylalkohole (**7a** / **9a**) und -aldehyde (**11a** / **1a**).

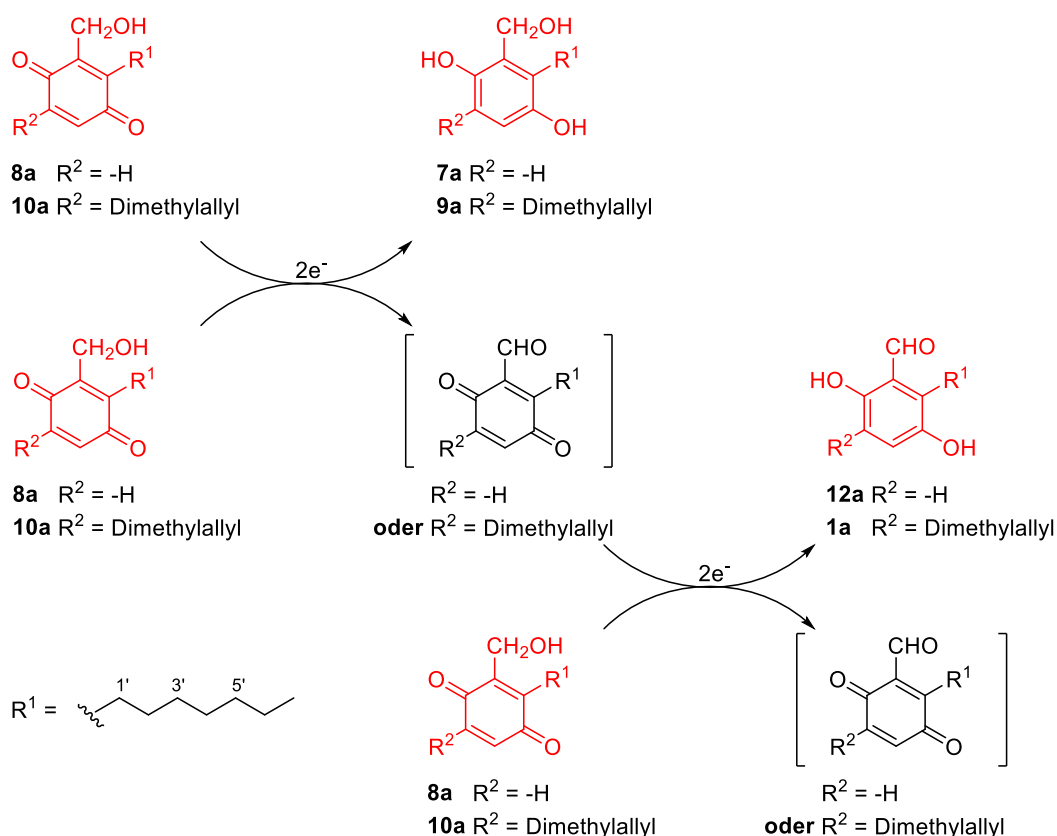


Abbildung 96: Postulierte Redoxreaktionen zwischen den Chinonformen der Intermediate

Es ist denkbar, dass die Chinon-Alkohole selbst als Elektronendonator und -akzeptor fungieren. Über ein instabiles Benzochinon-Aldehyd Intermediat könnten sowohl die Hydrochinonformen der Benzylalkohole als auch der Benzaldehyde gebildet werden.

5.1.6 Prenylierung der 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkoholintermediate durch FogH und Bedeutung der Hydroxymethylgruppe am Aromaten

Nach der Deletion des Gens *fogH* akkumulierten in *A. nidulans* JN006 die 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkohole **7a** – **7d** (Kapitel 4.1.6.1). Die Menge der akkumulierten Intermediate mit mehrfach ungesättigter Seitenkette **7c** und **7d** war hier im Vergleich zu denen des $\Delta fogE$ -Stamms JN006 **6c** und **6d** reziprok. Dieser Fakt ist noch immer Gegenstand der Diskussion und es besteht noch keine potenzielle Erklärung dafür. *In vitro*-Assays mit FogH und **7a** führten zur Prenylierung an C5 und bestätigten damit die Funktion von FogH als aromatische Prenyltransferase in der Flavoglucinbiosynthese (Kapitel 4.1.6.2). Das zum Chinon oxidierte **8a** wurde von FogH auch prenyliert. Die Reaktionskinetik von FogH mit beiden Substraten zeigte, dass das Hydrochinon **7a** effizienter umgesetzt wird. Das ergibt Sinn, da im Pilz hauptsächlich das Hydrochinon vorliegt, um aber eine vollständige Prenylierung der Intermediate des Pathways zu gewährleisten ist FogH auch dem Chinon **8a** gegenüber promiskuitiv.

Die Disproportionierungsreaktion des Chinons **8a** führte, wie zuvor gezeigt, nicht nur zum Hydrochinon des Benzylalkohols **7a**, sondern auch zu seinem Benzaldehyd **11a**. *In vitro*-Assays von FogH mit **11a** zeigten, dass dieses nicht prenyliert wird. Das erklärt, warum die ersten aromatischen Intermediate in zwei Reduktionsschritten als 2-Alkyl-Salicylalkohole von der PKS freigesetzt werden, obwohl

sie final wieder zu Aldehyden reoxidiert werden müssen. Das unterscheidet den *fog*-Pathway deutlich von anderen bekannten Biosynthesewegen: Typischerweise setzen aromatische PTs Benzoessäurederivate, Lactone oder Aldehyde um.^{517–519} Im Falle der Ascofuranonbiosynthese in *Acremonium egyptiacum* z.B. wird Orsellinsäure zuerst prenyliert, bevor die Reduktion zum Aldehyd Illicolinsäure erfolgt.³²² Genauso verhält es sich bei der Herstellung von LL-Z1272β durch *Stachybotrys bisbyi*: Die Reduktion der Carbonsäure zum Aldehyd LL-1272β findet erst nach der Prenylierung von Orsellinsäure zu Grifolsäure statt.³²³

Die Wahrscheinlichkeit ist hoch, dass die Hydroxymethylfunktion auch für die Reaktion des CYP Enzyms FogE essenziell ist, da in der Trichoxidbiosynthese das aromatische Salicylaldehydintermediat erst durch das FogG-Homolog VirG zu einem Salicylalkohol reduziert wird, bevor die CYP VirE die Hydroxylierung vornimmt.²⁴⁴

5.1.7 Reoxidation der prenylierten 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkoholintermediate zu den finalen Aldehyden durch FogF

Durch Deletion des Gens für die FAD-abhängige Oxidoreduktase FogF in *A. nidulans* JN004 akkumulierten im resultierenden Stamm JN010 die prenylierten 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkoholintermediate **9a** – **9d**. Eine moderate Menge der finalen Aldehydprodukte konnte auch detektiert werden, die höchstwahrscheinlich durch besagte Disproportionierungsreaktion der Chinone entstanden. Da aber sowohl im Ursprungsorganismus *A. ruber* QEN-0407-G2 als auch im Clusterexpressionsstamm *A. nidulans* JN004 keine dieser prenylierten Benzylalkoholintermediate detektiert wurden, deutete dies darauf hin, dass FogF in der Tat für die Reoxidation der Hydroxymethylgruppe zu einem Aldehyd verantwortlich war. Diese Annahme wurde durch Fütterungsexperimente mit dem *fogF*-exprimierenden Stamm *A. nidulans* JN025 bestätigt. Im Vergleich zur Negativkontrolle wurde beinahe das komplette Substrat **9a** zu den finalen Aryl-Aldehyden umgesetzt. Auch nach Zufüttern des Chinons **10a** wurde die vollständige Konversion zum Aldehyd beobachtet. Allerdings ist zu vermuten, dass die in Kapitel 5.1.5 besprochenen, durch den Pilz geschaffenen Bedingungen, eine Reduktion zum Hydrochinon **9a** bewirkten, welches anschließend von FogF umgesetzt wurde.

Das FogF-Homolog SrdI katalysiert während der Sordarialbiosynthese auch die Oxidation der Hydroxymethylgruppe zu einem Aldehyd. Basierend auf dem Aldehyd-Endprodukt wird vermutet, dass diese Oxidation vor der weiteren Modifikation des Polyketids durch das Cupin SrdB stattfindet und es wurde nie nachgewiesen, ob dieses Enzym auch das Intermediat mit der Hydroxymethylgruppe akzeptiert. Dadurch postulieren die Autoren dieser Studie, dass das durch die Expression der essenziellen Gene *srdACDE* in *A. nidulans* entstandene Polyketid nicht als observierter Salicylalkohol sondern als Aldehyd freigesetzt wird, der direkt von einer endogenen *A. nidulans*-Reduktase zum Salicylalkohol reduziert wird.⁴⁸⁸ Das ist im Falle des *fog*-Pathways allerdings auszuschließen, da nur der Salicylalkohol von FogH prenyliert werden kann. Das FogF-Homolog aus der Trichoxidbiosynthese scheint keine offensichtliche Funktion vorzuweisen. Wie zuvor erwähnt katalysiert hier VirG eine Reduktion des Salicylaldehydintermediats zum Salicylalkohol, bevor dieses weiter modifiziert wird. Im Gegensatz dazu scheint FogG in der Flavoglucinbiosynthese keine Funktion auszuüben (Abbildung

55E und Abbildung 61C). Trichoxid, das Endprodukt des *vir*-Pathways, weist noch immer die reduzierte Hydroxymethylgruppe auf und wird nicht wie in der Flavoglaucinbiosynthese reoxidiert.²⁴⁴

Durch Zufüttern des unprenylierten Intermediats **7a** zum *fogF*-Expressionsstamm JN025 wurde gezeigt, dass die Prenylgruppe an C5 für die Reoxidation des Polyketids durch FogF essenziell ist (Abbildung 72A). Damit wurde die Reoxidation der Hydroxymethylgruppe zum Aldehyd als finaler Schritt der Flavoglaucinbiosynthese bestätigt.

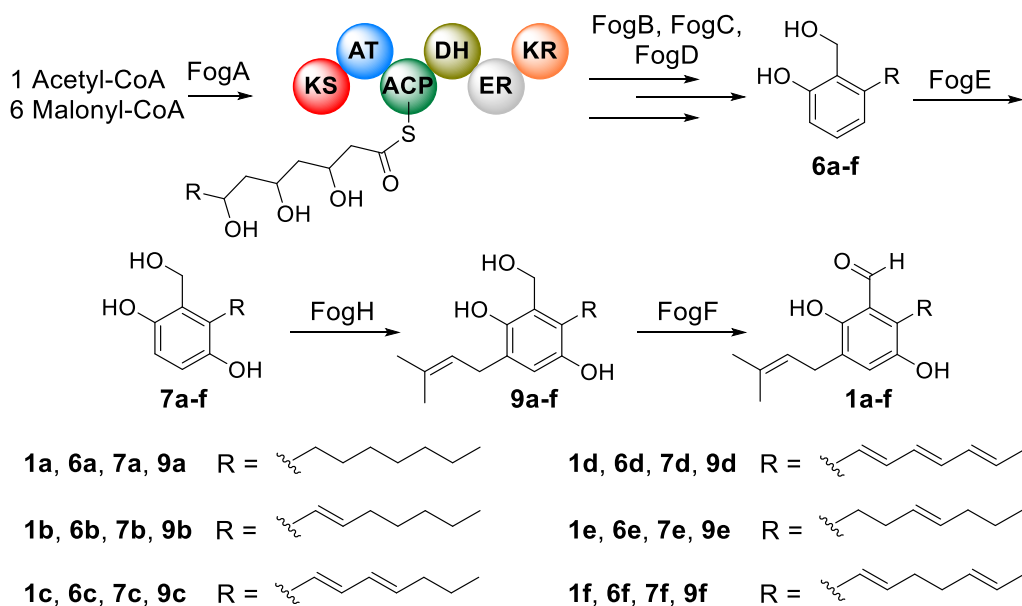
Während der Isolierung der prenylierten 2-Alkyl-3,6-Dihydroxy-Benzylalkohole aus dem $\Delta fogF$ -Stamm *A. nidulans* JN010 stellte sich heraus, dass **9b – 9d** nicht nur zu den Chinonen **10b – 10d** oxidieren, sondern durch ihre Doppelbindung zwischen C2' und C3' in der Seitenkette anschließend eine intramolekulare Zyklisierung durchlaufen. Daraus resultierten Produkte mit einem Benzofurankern **12b – 12d**. Aus *A. ruber* wurden ebensolche Derivate **14b – 14d** isoliert, allerdings besaßen diese anstelle der Hydroxymethylgruppe schon den Aldehyd.⁹² Da die finalen Aldehydprodukte mit der Δ^2 -Doppelbindung **1b – 1d** auch außerhalb des Pilzes stabil vorlagen konnte angenommen werden, dass die Oxidation zum Aldehyd nach der Bildung des Benzofurankerns stattfindet. Aus diesem Grund wurde auch **12b** als potenzielles Substrat von FogF in einem Fütterungsexperiment mit *A. nidulans* JN025 getestet (Abbildung 72B). Die Bildung des erwarteten Aldehyds **14b** blieb aus, stattdessen entstand ein anderes Produkt, welches bisher noch nicht identifiziert wurde. Da nur eine geringe Menge des Substrats **12b** vorhanden war, konnte das Fütterungsexperiment zur Isolierung des neuen Produkts nicht kurzfristig hochskaliert werden, um es in ausreichender Menge für die Strukturaufklärung zu isolieren.

5.1.8 Aktuelles Verständnis der Flavoglaucinbiosynthese in *A. ruber*

Basierend auf den Ergebnissen aus den Gendeletionen im heterologen Expressionsstamm *A. nidulans* JN004 in Kombination mit FogH-*in vitro*-Assays und Fütterungsexperimenten mit der *fogF*-Expressionsmutante *A. nidulans* JN025 kann folgender Weg für die Biosynthese von Flavoglaucin und seinen Analoga vorgeschlagen werden (Abbildung 97):

Die HR-PKS FogA (EYE95336) synthetisiert aus einem Molekül Acetyl-CoA und sechs Molekülen Malonyl-CoA ein C₁₄-Polyketid. Die Aromatisierung und reduktive Freisetzung dieses Polyketids als erstes Intermediat erfolgt nur in Anwesenheit von FogB (5' Teil von EYE95337), FogC (3' Teil von EYE95337) und FogD (EYE95338) (Kapitel 4.1.5). Ohne diese zusätzlichen Enzyme entsteht nur eine offenkettige Carbonsäure **2d**, die als Shuntprodukt durch spontane Hydrolyse von FogA abgespalten wird (Abbildung 46). Das Polyketid wird nicht wie erwartet als 2-Alkyl-Salicylsäure oder 2-Alkyl-Salicylaldehyd von der PKS abgespalten, sondern als 2-Alkylsalicylalkohole **6a – 6d** freigesetzt (Abbildung 61). Das CYP Enzym FogE (EYE95339) hydroxyliert die Intermediate an C3 und bildet damit die 2-Alkyl-3,6-Dihydroxybenzylalkohole **7a – 7d** (Kapitel 4.1.5.4). Durch die Prenylierung an C5, katalysiert durch FogH (EYE95342), entstehen **9a – 9d** (Kapitel 4.1.6). Die Hydroxymethylgruppe der Intermediate ist in diesem Fall essenziell für die Prenylierung durch FogH und unterstreicht die Notwendigkeit der reduktiven Freisetzung des Polyketids als 2-Alkyl-Salicylalkohol. In einem letzten Schritt wird diese Hydroxymethylgruppe von der FAD-abhängigen Oxidase FogF (EYE95340) zu Aldehyden oxidiert und

liegen damit als Flavoglaucin und seine Analoga **1a – 1h** vor (Kapitel 4.1.7). FogG (EYE95341) scheint in der Flavoglaucinbiosynthese keine offensichtliche Funktion zu erfüllen (Abbildung 55E und Abbildung 61B). Die genaue Interaktion von FogA mit FogBCD, die zur Aromatisierung und zu den verschiedenen Verhältnissen der Produkte mit unterschiedlicher Sättigung der C₇-Seitenkette führt, bedarf noch weiterer Untersuchung.



Intermediate der **e** und **f** Serie wurden nicht isoliert

Abbildung 97: Vorgeschlagener Biosyntheseweg von Flavoglaucin und seinen Analoga.

5.2 Untersuchungen zur Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie

5.2.1 Heterologe Expression und Erweiterung des *ech*-Cluster in *Aspergillus nidulans*

Die Substanzen der Echinulin-Familie stellen die Hauptmetabolite in *A. ruber* QEN-0407-G2 dar. Die gebildeten Produkte umfassen dabei sowohl Moleküle der Echinulin-, der Neoechinulin A-, als auch der Neoechinulin B-Serie. Diese Produkte unterscheiden sich außerdem noch in der Anzahl und Position ihrer Prenylierungen.

Die Gene des *ech*-Clusters wurden im Rahmen einer zuvorigen Studie identifiziert.¹¹⁸ Diese Studie fokussierte sich hauptsächlich auf die Prenylierungsreaktionen, die von EchPT1 und EchPT2 katalysiert werden und lieferte keine experimentellen Daten zum Rest des Clusters. Die eindeutige Zuordnung des Clusters zu den Indolalkaloiden der Echinulin-Familie blieb damit noch aus.

Zur zweifellosen Bestätigung, dass dieser Cluster für die Biosynthese der Echinulin-Metabolite verantwortlich ist, wurde er in *A. nidulans* LO8030 heterolog exprimiert. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass in Extrakten des *ech*-Clusterexpressionsstamms JN019 nur Substanzen der Echinulin- und der Neoechinulin A-Serie gebildet wurden (Abbildung 80). Neoechinulin B und seine mehrfach prenylierten Derivate konnten in Extrakten dieses Stamms nicht detektiert werden. Dies wies darauf hin, dass das CYP-Enzym EchP450 nur die Doppelbindung zwischen C10 und C11 außerhalb des Diketopiperazinkerns einführt. In der zuvor zitierten früheren Studie wurde postuliert, dass EchP450 auch die Dehydrierung zwischen C14 und C17 katalysiert, aber da der *ech*-Clusterexpressionsstamm JN019 keine Substanzen der Neoechinulin B-Serie produzierte, konnte diese Hypothese als unwahrscheinlich betrachtet werden.

Der *ech*-Cluster wurde damit zwar experimentell der Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie zugeordnet, allerdings schien ein weiteres Gen notwendig zu sein, um Substanzen der Neoechinulin B-Serie zu produzieren. Wie in Kapitel 4.1.2 schon näher erläutert wurde, ist die Voraussage der Grenzen eines BGC nicht immer korrekt, sodass Gene, die in der Nähe des vorgeschlagenen Clusters liegen möglicherweise auch noch an der Biosynthese desselben Metaboliten beteiligt sind. Die Analyse der umgebenden Gene ergab, dass drei weitere Gene stromaufwärts von *echPT2* eine mögliche Oxidoreduktasefunktion aufweisen könnten. Laut automatischer Annotation durch NCBI kodiert das Gen EURHEDRAFT_409077 für eine NADH-abhängige Flavinoxidoreduktase. Diese Enzyme gehören zur Überfamilie der Old-Yellow-Enzyme und katalysieren typischerweise die Reduktion einer Doppelbindung.⁵²⁰ Damit ist die Einführung einer Doppelbindung zwar unwahrscheinlich, allerdings sind auch Fälle bekannt, in denen diese Art von Enzymen eine Dehydrogenase-Funktion übernehmen und eine Doppelbindung einführen. Substrate für diese Oxidationen sind allerdings meistens zyklische Ketone oder Tetralone.^{521,522} EURHEDRAFT_374803 weist laut der NCBI *conserved domain database* eine für Enoyl-Reduktasen typische Domänenarchitektur auf. Eine BLAST-Analyse ergab u.a. Ähnlichkeiten zu Chinon-Oxidoreduktasen oder Alkohol-Dehydrogenasen. Jedoch katalysiert keine dieser Enzymtypen typischerweise die Einführung einer Doppelbindung. Das durch EURHEDRAFT_400000 kodierte Enzym ist laut der NCBI *conserved domain database* einer Acyl-CoA-Oxidase ähnlich, die in der Regel die β -Oxidation von Fettsäuren durch Dehydrogenierung der Bindung

zwischen dem α - und β -Kohlenstoff einleitet.⁵²³ Basierend auf den genannten Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen waren alle drei putativen Oxidoreduktasen keine wahrscheinlichen Kandidaten, um die notwendige Dehydrogenierung eines zyklischen Dipeptids zu katalysieren, allerdings ließ sich diese Option nicht komplett ausschließen und in der Nähe des *ech*-Kernclusters konnte kein vielversprechenderer Kandidat gefunden werden. Zur Überprüfung, ob nicht doch eines der genannten Oxidoreduktasene Gene die fehlende Reaktion zur Bildung der Neoechinulin B-Serie katalysiert, wurde der in *A. nidulans* JN019 eingebrachte Cluster um die Gene EURHEDRAFT_528589 bis EURHEDRAFT_400000 aus *A. ruber* erweitert.

Der Extrakt des Stammes mit dem erweiterten *ech*-Cluster *A. nidulans* JN044 glich dem von JN019, abgesehen von der leicht erhöhten Produktion der Echinulinderivate (Abbildung 82). Keines der zusätzlich exprimierten Enzyme schien in der Lage zu sein, die Δ^{14} -Doppelbindung einzuführen. Das dafür verantwortliche Gen scheint separat vom Rest des *ech*-Clusters im *A. ruber*-Genom vorzuliegen. Ein bemerkenswertes Merkmal von Pilzgenomen ist, dass Gene, die an sukzessiven Schritten eines Stoffwechselweges beteiligt sind, häufig physikalisch verknüpft oder geclustert sind.¹²⁷ Für diese Regel gibt es auch Ausnahmen. In die Biosynthese von prenylierten Xanthonen in *A. nidulans* sind sowohl zehn geclusterte, als auch drei separate, auf anderen Chromosomen gelegene, Gene involviert.¹⁷⁵ Gene für die Biosynthese von Dothistromin sind auf sechs verschiedene Loci des Chromosoms 12 in *Dothistroma septosporum* verteilt.⁵²⁴ Es ist daher plausibel auch außerhalb des unmittelbaren genetischen Umfelds des *ech*-Kernclusters nach einem Kandidaten für die Dehydrogenierung zu suchen.

5.2.2 Heterologe Expression von *echP450* in *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*

Die heterologe Expression von *echP450* in *E. coli* führte nicht zur Produktion von funktionellem Protein. Aufgrund der Transmembrandomäne war zu erwarten, dass das unmodifizierte CYP nicht ohne weiteres zu produzieren war, aber auch die durchgeführten Modifikationen des N-Terminus führten nicht zum Erfolg. Trotz vieler gelungener Expressionen eukaryotischer CYP Enzyme mit abgetrennter Transmembrandomäne^{449–451} wurde allerdings auch schon gezeigt, dass diese Deletionen zum Verlust der Proteinfunktion führen können.⁵²⁵

Vor einiger Zeit wurde eine Serie von Chimären aus pilzlichen CYP Enzymen mit N-terminalen Domänen von anderen CYPs geschaffen, mit dem Ziel ihr Potenzial für eine effiziente Produktion in *E. coli* zu ermitteln. Dabei erwies sich der Austausch der N-Terminalen Domäne komplett bis zur Prolinreichen Region durch die Aminosäuren 8 – 26 von CYP5144C1 aus *Phanerochaete chrysosporium* als eine der erfolgreichsten Modifikationen.^{526,527} Teilweise wurde neben N-terminalen Modifikationen auch Chaperon/Chaperonin-Koexpression oder Gensynthese zur Optimierung der Codon-Usage angewandt, um die Expression von CYPs verschiedener Organismen in *E. coli* zu verbessern.^{528,529} Auch die Erschaffung eines künstlichen Fusionsproteins aus CYP und einer CPR führte schon zum Erfolg.⁵³⁰ Kürzlich erbrachte die Expression der Häm-Bindedomäne eines CYPs funktionelles Protein, wohingegen die Produktion des kompletten Proteins nicht erfolgreich war.⁵³¹ Wie durch die angeführten Beispiele deutlich wird, reagieren verschiedene CYPs unterschiedlich gut auf bestimmte Modifikationen und eine pauschale Aussage über den Erfolg einer Modifikation ist nicht möglich. Es ist denkbar, dass

eine der genannten Modifikationen zur erfolgreichen Produktion von EchP450 in *E. coli* geführt hätte. Ein weiteres Hindernis in der rekombinanten Produktion von CYPs ist die mangelnde Verfügbarkeit von Häm als Kofaktor. Die Biosynthese von Protoporphyrin IX spielt bei der Bildung des CYP-Holoenzym eine entscheidende Rolle und die Produktion der Vorstufe 5-Aminolävulinsäure ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in diesem Prozess.⁵³² Diese Einschränkung kann durch Zugabe von 5-Aminolävulinsäure und Eisen(II)/Eisen(III) ins Produktionsmedium umgangen werden.^{533,534}

Die Biotransformationsexperimente mit *S. cerevisiae* zeigten trotz der Vorteile gegenüber der Expression in *E. coli* keinen Umsatz, unabhängig vom eingesetzten Substrat (Abbildung 88). Das lässt darauf schließen, dass EchP450 nicht funktionell produziert wurde. Falls nur geringe Mengen EchP450 funktionell hergestellt wurden, hätte die Isolierung der mikrosomalen Fraktionen möglicherweise dafür gesorgt, dass ausreichend Enzym angereichert wird, um Umsatz mit dem passenden Substrat zu beobachten. Außerdem ist es möglich, dass die biologische Verfügbarkeit von extern zugegebenen Substanzen in Biotransformationsexperimenten mit ganzen Zellen nicht unbedingt gegeben ist, sodass direkter Kontakt der Mikrosomen mit potenziellen Substraten die Chance auf Umsatz erhöht hätte.

5.2.3 EchP450 katalysiert nur die Einführung der Δ^{10} -Doppelbindung in Preechinulin

Nach den erfolglosen Expressionsversuchen in *E. coli* und *S. cerevisiae* wurde *echP450* in *A. nidulans* LO8030 exprimiert und durch Fütterungsexperimente auf seine Funktion überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass EchP450 nur das C2-revers-prenylierte zyklische Dipeptid Preechinulin (**16**) umsetzt (Abbildung 90). Die reverse Prenylierung an C2 schien dafür essenziell zu sein, da keine Produktbildung mit cyclo-L-Trp-L-Ala (**15**) stattfand. Weitere Prenylierungen am Tryptophansubstituenten, wie z.B. an C5 bei Tardioxopiperazin A (**17**) führten dazu, dass keine Konversion durch EchP450 mehr stattfand (Abbildung 91). Durch Zugabe von Neoechinulin A zu dem *echP450*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN042 konnte nun auch zweifellos bestätigt werden, dass EchP450 die Δ^{14} -Doppelbindung nicht einführt. Wie die Expressionsergebnisse vermuten lassen, liegt das dafür zuständige Gen mit hoher Wahrscheinlichkeit an anderer Stelle im Genom von *A. ruber* vor.

Neben dem in dieser Arbeit untersuchten *echP450* gibt es noch ein weiteres Beispiel für eine α,β -Dehydrogenierung von zyklischen Dipeptiden durch CYP-Enzyme in einem Pilz. Das CYP Pc21g15470 katalysiert die Bildung der *exo*-Doppelbindung des cyclo-L-His-L-Trp-Derivats Roquefortin D zu Roquefortin C in *Penicillium chrysogenum*.⁴⁰⁰ Die naheliegendste Alternative für die Bildung der Δ^{14} -Doppelbindung bei der Biosynthese von Molekülen der Neoechinulin B-Serie wäre ein anderes Cytochrom P450 Enzym. Eine BLAST-Analyse von EchP450 gegen das *A. ruber*-Genom zeigte mehr als 47 weitere kodierte, putative CYP Enzyme. Davon kann FogE (EYE95339) ausgeschlossen werden, da dieses in die Biosynthese der Flavoglaucinanaloge involviert ist. Es ist denkbar, dass ein CYP-Enzym, das eine α,β -Dehydrogenierung eines zyklischen Dipeptids katalysiert EchP450 ähnlicher ist, als ein CYP-Enzym mit Monooxygenasefunktion. Daher könnte ein möglicher Kandidat unter den ähnlichsten Enzymen zu finden sein. Das nächste ähnliche Enzym zu EchP450 ist das CYP EYE91288 (40,67 %ige Identität bei einem Query-Cover von 94 %), dessen Gen ungeclustert vorliegt. Es folgen vier weitere ähnliche Proteine mit Identitäten zwischen 30 und 37 % bei einem Query-Cover über 85 % (EYE91096, EYE92370, EYE90618, EYE90112), bevor die Monooxygenase FogE als Hit (30,66 %ige

Identität bei einem Query-Cover von 91 %) angegeben wird. Es ist möglich das komplette CYPom von *A. ruber* unter Verwendung von Datenbanken wie der Fungal Cytochrome P450 Database (<http://p450.riceblast.snu.ac.kr/>) oder den *International P450 Nomenclature Committee Databases* (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>) basierend auf Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz weiter zu organisieren und zu kategorisieren, um andere potenzielle Kandidaten zu finden oder auszuschließen.^{535–537}

In anderen Organismen wie Actinobakterien wird die α,β -Dehydrogenierung zyklischer Dipeptide durch Cyclodipeptidoxidasen (CDOs) katalysiert. Im Falle der Biosynthese von Albonoursin (Didehydro-cyclo-L-Phe-L-Leu) in *Streptomyces noursei* besteht die CDO aus einem Enzymkomplex der Untereinheiten AlbA und AlbB, die beide für die α,β -Dehydrogenierung benötigt werden.^{538–540} Die CDO bindet den Kofaktor FAD kovalent und nutzt molekularen Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor. Im Gegensatz zur EchP450 ist AlbA/AlbB in der Lage sequenziell Doppelbindungen an beiden Substituenten des 2,5-Diketopiperazin-Grundgerüsts einzuführen.⁵⁴¹ Der ähnliche CDO-Enzymkomplex bestehend aus NDAS_1146 und NDAS_1147 ist an der Biosynthese von verschiedenen Nocazinen (basierend auf cyclo-L-Tyr-L-Phe) in *Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111 beteiligt und katalysiert die Dehydrogenierung von phenylalanin- und tyrosinhaltenen zyklischen Dipeptiden.⁵⁴² Eine vergleichende Studie mit den bekannten und dem neuen Enzymkomplex CDO_Np aus *Nocaridopsis prasina* zeigte, dass CDOs eine breitgefächerte Akzeptanz gegenüber zyklischen Dipeptiden mit aromatischen Aminosäuren aufweisen.⁵⁴³ Eine BLAST-Analyse der Aminosäuresequenzen von AlbA/AlbB und Ndas_1146/_1147 gegen die kodierten Proteine des *A. ruber*-Genoms blieb ergebnislos.

Einige Vertreter der vielseitigen α -Ketoglutarat-abhängigen mononuklearen nicht-Häm Eisen-Enzyme (α KG-NHFe) sind ebenso in der Lage eine α,β -Dehydrogenierung von zyklischen Dipeptiden zu katalysieren.^{544,545} Während der Bicyclomycinbiosynthese führt das bifunktionale Enzym BcmB eine Doppelbindung am Leucin-Substituenten des mehrfach hydroxylierten Intermediats ein, bevor es die Bildung eines Epoxids verursacht. Im letzten Schritt dieses Pathways katalysiert ein anderes α KG-NHFe BcmF die Einführung einer anderen Doppelbindung, was zur Bildung von Bicyclomycin führt. Auch zu diesen Enzymen konnten in *A. ruber* keine Homologe entdeckt werden, sodass wie angenommen wahrscheinlich ein CYP die Dehydrogenierung der Bindung zwischen C14 und C17 in Neoechinulin A (**16a**) durchführt.

5.2.4 EchPT2 prenyliert bevorzugt Substrate ohne Δ^{10} -Doppelbindung

Die weitere Metabolisierung von Preechinulin (**16**) stellt einen Verzweigungspunkt in der Echinulinbiosynthese dar. Entweder wird **16** direkt von EchPT2 weiter prenyliert oder durchläuft die Installation der Doppelbindung Δ^{10} durch EchP450, was zu Neoechinulin A (**16a**) führt. **16a** wird von EchPT2 ebenfalls weiter prenyliert. Dabei verhält sich EchPT2 anders als bei der Prenylierung von **16**. EchPT2-*in vitro*-Assays mit den beiden Substraten **16** und **16a** zeigten, dass das Substrat ohne Doppelbindung **16** besser akzeptiert wird und mit einer höheren Regioselektivität konsekutiv erst an C5 und anschließend an C7 zum Hauptprodukt der Echinulin-Serie Echinulin (**19**) umgesetzt wird (Abbildung 92).

16a hingegen wurde in geringerem Maße umgesetzt. Dabei schien, verglichen mit **16**, neben der Umsatzrate auch die Regioselektivität der Prenylierungen nachzulassen. Statt **16a** überwiegend erst an C5 und anschließend an C7 zu prenylieren, sodass hauptsächlich **19a** entsteht, fand die zweite Prenylierung durch EchPT2 auch häufiger an C4 statt, was in der Bildung von **20a** resultierte.

Bekannte PTs des DMATS-Typs wie z.B. FtmPT1,³⁴⁸ CdpC2PT,³⁵² AnaPT,⁵⁴⁶ FgaPT2,³⁴⁷ 5-DMATS,⁵⁴⁷ 6-DMATS_{SV}⁵⁴⁸ oder 7-DMATS⁵⁴⁹ katalysieren in der Regel eine einzige regiospezifische Prenylierung des Indolrings von Tryptophanderivaten oder tryptophanhaltigen zyklischen Dipeptiden. Während diese PTs in vielen Fällen auch unterschiedliche Substrate regiospezifisch prenylieren ändert sich die Regioselektivität der katalysierten Reaktion höchstens bei der Verwendung von unnatürlichen DMAPP-Analoga als Prenyldonor.⁵⁴⁸ Die CTrpPT hingegen prenyliert den Indolring von cyclo-L-Trp-L-Trp und anderen tryptophanhaltigen zyklischen Dipeptiden sowohl an C7, als auch an N1 und stellt damit bezüglich der Regioselektivität neben der EchPT2 eine Ausnahme dar.³⁵³

Durch Bestimmung der Enzymkinetik von EchPT2 sollte der effizientere Umsatz von **16** gegenüber dem von **16a** quantifiziert werden. Die weitere Konversion des Produkts nach der ersten Prenylierung verhinderte jedoch die exakte Bestimmung der kinetischen Parameter, sodass diese nur näherungsweise bestimmt werden konnten. Nach der ersten Prenylierung von **16** an C5, folgte umgehend die nächste Prenylierung an C7 zu **19**, sodass **17** währenddessen nicht akkumulierte. Die Beobachtung der Bildung des Produkts beider Reaktionen, **19**, zeigte eine Hemmung der Umsatzgeschwindigkeit bei höheren Substratkonzentrationen. Beim Umsatz von Neoechinulin A (**16a**) akkumulierte das Produkt der ersten Prenylierung **17a** deutlich und wurde weniger effizient zu **19a** weiterprenyliert. Die Bildungsrate von **17a** schien beinahe einer Michaelis-Menten-Kinetik zu folgen, wohingegen die Produktionsgeschwindigkeit des triprenylierten **19a** mit steigender **16a**-Konzentration auch eine Hemmung aufzeigte. **17a** als alleiniges Substrat für EchPT2 führte in höheren Konzentrationen auch zur Inhibition des Umsatzes. Die kinetischen Parameter wurden nur anhand der angepassten Kurve abgelesen, machten aber auch dabei schon deutlich, dass **16** wesentlich effizienter umgesetzt wird als **16a**. Der Mechanismus der Substratinhibition oder die mögliche Kooperativität der Bindung von mehreren Substratmolekülen ans Enzym wäre ein überaus interessanter Gegenstand weiterer Studien, wird aber durch die Verwendung des ersten Produkts als Substrat für eine zweite Prenylierung erschwert.

5.2.5 Aktuelles Verständnis der Echinulinbiosynthese in *A. ruber*

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten liefern neue Einsichten in die Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie, speziell für die Schlüsselrollen der EchP450 und der EchPT2 in Bezug auf die strukturelle Diversifikation ihrer Produkte. Zusammen mit den Daten für beide Prenyltransferasen aus einer vorherigen Studie kann das aktuelle Verständnis der Echinulinbiosynthese in *A. ruber* folgendermaßen zusammengefasst werden (Abbildung 98).¹¹⁸

Die initiale Kondensation zwischen den Aminosäuren L-Tryptophan (L-Trp) und L-Alanin (L-Ala) zum zyklischen Dipeptid cyclo-L-Trp-L-Ala (**15**) wird durch die dimodulare NRPS EchPS (EYE98744) katalysiert. EchPT1 (EYE98744) überträgt einen Dimethylallylrest in reverser Manier auf C2 des Indolrings

und verursacht so die Bildung von Preechinulin (**16**). Dieser Schritt ist Voraussetzung für die weitere Metabolisierung, da **15** nicht durch EchP450 (Abbildung 90B) oder EchPT2 als Substrat akzeptiert wird.¹¹⁸ Die weitere Modifikation von **16** repräsentiert einen Verzweigungspunkt in diesem Stoffwechselweg. Preechinulin (**16**) durchläuft entweder über die EchPT2 (EYE98746) weitere Prenylierungsreaktionen, was zu Molekülen der Echinulin-Serie führt, oder wird durch das CYP Enzym EchP450 (EYE98745) oxidiert, was in der Bildung der Doppelbindung Δ^{10} und damit den Substanzen der Neoechinulin A-Serie resultiert. EchPT2 prenyliert **16** hauptsächlich an C5 oder in geringerer Rate an C7. Die C7-Prenylierung führt zur Akkumulierung des Nebenprodukts Tardioxopiperazin B (**18**), was von der EchPT2 nicht weiter umgesetzt werden kann. Im Gegenzug dazu kann das C5-prenylierte Tardioxopiperazin A (**17**) erneut von EchPT2 prenyliert werden: entweder überwiegend an C7, um das Hauptprodukt der Echinulin-Serie Echinulin (**19**) zu bilden oder in signifikant geringerem Maße auch an C4, was in Variecolorin L (**20**) resultiert.¹¹⁸ In Konkurrenz mit EchPT2 katalysiert EchP450 die Dehydrogenierung von **16** zwischen C10 und C11, aber nicht zwischen C14 und C17 (Abbildung 90A und Abbildung 91A). Das daraus entstehende Produkt Neoechinulin A (**16a**) ist das Hauptprodukt der Neoechinulin A-Serie und auch der dominanteste Metabolit im ursprünglichen Produzenten *A. ruber* (Abbildung 77) sowie den heterologen *A. nidulans* Expressionsstämmen (Abbildung 80 und Abbildung 82). Der Grund dafür ist die niedrigere Konversion von **16a** durch EchPT2. Geringe Mengen **16a** werden durch EchPT2 zu unterschiedlich prenylierten Derivaten umgesetzt. Dabei ist die Effizienz und die Regioselektivität der Prenylierungen aber deutlich geringer als bei den Substanzen der Echinulin-Serie ohne die Doppelbindung Δ^{10} . Nach der C5-Prenylierung von **16a** kann das Produkt Isoechinulin A (**17a**) an C7 erneut prenyliert werden, wodurch Dehydroechinulin (**19a**) gebildet wird. Durch die geringere Regioselektivität von EchPT2 gegenüber Substanzen der Neoechinulin A-Serie findet die zweite Prenylierung in höherem Maße auch an C4 statt, sodass mehr Dehydrovariecolorin L (**20a**) gebildet wird, als es im Vergleich dazu für **20** der Fall ist (Abbildung 92). Wie auch **18**, ist Variecolorin G (**18a**) ein Nebenprodukt und wird nicht weiter von EchPT2 akzeptiert. Für die Bildung von Metaboliten der Neoechinulin B-Serie wird ein weiteres, unbekanntes Enzym benötigt, was die Doppelbindung zwischen C14 und C17 installiert. Dieses Enzym konnte in dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Es ist wahrscheinlich, dass dieses Enzym **16a** zu Neoechinulin B (**16b**) konvertiert. Davon wird ein geringer Teil von EchPT2 weiter prenyliert. Es ist denkbar, dass dieses unbekannte Enzym im Gegensatz zur EchP450 auch multiprenylierte Substrate akzeptieren kann, was die höhere Akkumulierung von Metaboliten der Neoechinulin B-Serie, speziell **18b** und **20b**, im Vergleich zu ihren Pendants mit nur einer Doppelbindung, **18a** und **20a**, in *A. ruber* erklären würde (Abbildung 77).

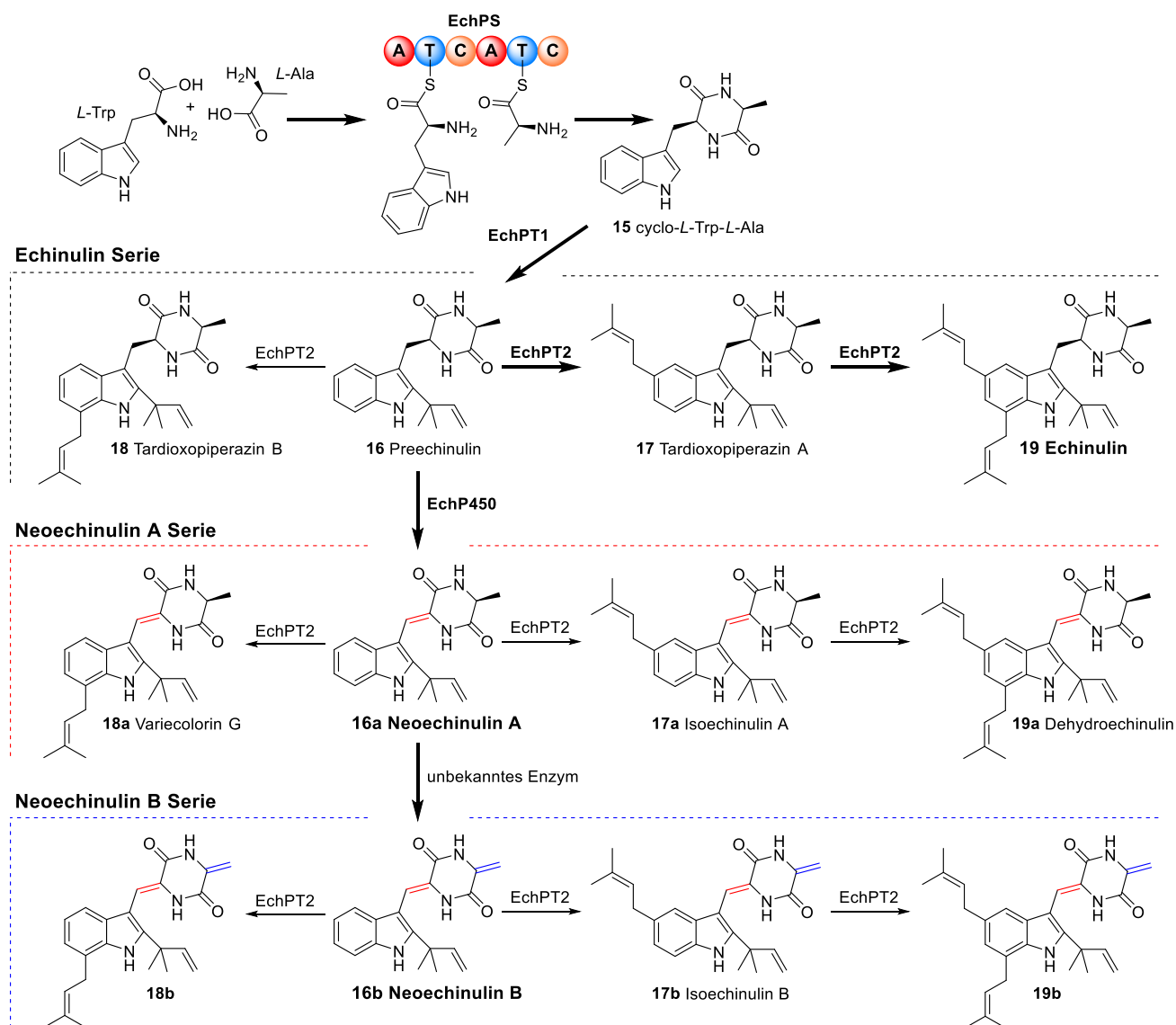


Abbildung 98: Vorgeschlagener Biosyntheseweg von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie

Die Produkte **20**, **20a** und **20b**, die aus der zweifachen Prenylierung von **16**, **16a** und **16b** an C4 und C5 hervorgehen sind aus Platzgründen nicht mit abgebildet.

6 Perspektiven zur Weiterführung der Projekte

6.1 Biosynthese von Flavoglaucinanaloga

Obwohl grundsätzliche Schritte in der Biosynthese von Flavoglaucin und seinen Analoga durch die Arbeiten zu dieser Dissertation aufgeklärt wurden, gibt es noch immer einige offene Fragen, deren Aufklärung für ein detaillierteres Verständnis des Pathways sorgen würde.

- **Interaktionen zwischen der HR-PKS FogA und FogBCD:**

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente konnten das genaue Zusammenspiel zwischen diesen vier Enzymen nicht näher beleuchten. Zur Produktion des ersten aromatischen Intermediaten können zwar Parallelen zur Trichoxidbiosynthese gezogen werden, allerdings fehlen zur Bestätigung oder Widerlegung der in der Diskussion vorgeschlagenen Hypothese noch experimentelle Daten. Da vermutet wird, dass FogBCD die Modifikationen an FogA-gebundenem Polyketid vornimmt müsste zur Untersuchung der einzelnen Proteinfunktionen die Bindung potenzieller Substrate an eine PKS simuliert werden. Es ist bekannt, dass Acyl-Thioester konjugiert mit N-Acetylcysteamin (SNAC) von verschiedenen PKS-Komponenten als Ersatz für ACP-gebundene Zwischenprodukte akzeptiert werden.⁵⁵⁰ Daher könnten *in vitro*-Assays mit rekombinantem FogB, FogC und FogD mit SNAC-Konjugaten möglicher offenkettiger oder schon zyklisierter Substrate einen näheren Einblick in die Reoxidation, reduktive Freisetzung und Sättigung der Seitenkette liefern.

- **Notwendigkeit der Hydroxymethylgruppe für die Hydroxylierung durch FogE:**

Durch *in vitro*-Assays wurde schon nachgewiesen, dass die Hydroxymethylgruppe der Intermediate essenziell für die Akzeptanz als Substrat der Prenyltransferase FogH ist. Das unterstreicht die Notwendigkeit der reduktiven Freisetzung des ersten aromatischen Intermediats als 2-Alkyl-Salicylalkohol. Es wäre interessant herauszufinden, ob auch das CYP-Enzym FogE ausschließlich Intermediate mit Hydroxymethylgruppe akzeptiert oder ob es auch 2-Alkyl-Salicylaldehyde umsetzt. Die einfachste Möglichkeit zur Überprüfung der FogE-Aktivität wären Fütterungsexperimente, wie sie mit dem *echP450*-Expressionsstamm *A. nidulans* JN042 durchgeführt wurden. Dabei würde sich auch zeigen, ob zugefütterte 2-Alkyl-Salicylaldehydintermediate von einer endogenen Reduktase aus *A. nidulans* zu den Alkoholen reduziert werden, wie es für die Sordarialbiosynthese postuliert wurde.⁴⁸⁸

- **Funktion von FogG:**

Die für diese Arbeit durchgeführten Arbeiten konnten keine konkrete Funktion für die SDR FogG in der Flavoglaucinbiosynthese nachweisen. In der Trichoxidbiosynthese katalysiert sein Homolog VirG die Reduktion eines 2-Alkyl-Salicylaldehydintermediats zu einem Alkohol.²⁴⁴ Dieser Schritt scheint im *fog*-Pathway auf den ersten Blick nicht notwendig zu sein. Durch *in*

vitro-Assays mit rekombinantem FogG könnte gezeigt werden, ob nicht eine vergleichbare Reduktion von Aldehyden zur Hydroxymethylgruppe katalysiert wird. Das wäre ein Hinweis auf die Reduktion eines als 2-Alkyl-Salicylaldehyd freigesetzten Intermediats durch ein endogenes *A. nidulans*-Enzym, was zur Beobachtung der Alkoholintermediate in den *A. nidulans*-Deletionsstämmen in dieser Arbeit geführt hätte. In Kombination mit den oben beschriebenen Fütterungsexperimenten eines *fogE*-Expressionsstamms ließe sich so auch die Reihenfolge der Reduktion und der Hydroxylierung bestimmen.

- **Regulation durch FogI:**

Bisher wurde nur nachgewiesen, dass FogI als positiver Regulator der Flavoglaucinbiosynthese wirkt. Es wäre interessant herauszufinden, welche Bedingungen dazu führen, dass dieser den *fog*-Pathway mehr oder weniger stark aktiviert. Außerdem könnte z.B. durch einen *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) detaillierter herausgefunden werden, an welchen Promotoren bzw. DNA-Sequenzen FogI agiert und durch Transkriptomanalyse könnte gezeigt werden, welche Expressionslevel der Gene des *fog*-Clusters von FogI unter welchen Bedingungen hochreguliert werden.

6.2 Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie

Mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten ist mittlerweile schon die zweite Publikation über die Biosynthese von Indolalkaloiden der Echinulin-Familie erschienen. Nichtsdestotrotz bleiben auch dabei noch einige Details ungeklärt.

- **Auffinden des unbekannten Enzyms für die Einführung der Δ^{14} -Doppelbindung:**

Das im *ech*-Kerncluster kodierte CYP Enzym EchP450 katalysiert nur die Einführung der Doppelbindung Δ^{10} und damit die Bildung von Molekülen der Neoechinulin A-Serie. Das verantwortliche Enzym für die zweite Doppelbindung Δ^{14} am Alanylsubstituenten ist noch immer unbekannt. In der Diskussion wurde näher erläutert, warum der potenzielle Kandidat mit hoher Wahrscheinlichkeit ein anderes CYP ist, dessen Gen auf einem anderen Locus im *A. ruber*-Genom vorliegt. Durch bioinformatische Analyse und Gruppierung aller in *A. ruber* kodierten CYPs kann vermutlich ein gewisser Teil der Enzyme für diese Reaktion ausgeschlossen werden. Über heterologe Expression der putativen Kandidaten in *A. nidulans* und Fütterungsexperimente mit Neoechinulin A (**16a**) bzw. Preechinulin (**16**) kann das verantwortliche Enzym möglicherweise aufgedeckt werden. Sollte die genetische Manipulation in den nahen verwandten Organismen *A. glaucus* oder *A. cristatus* effizienter funktionieren, könnten Deletionsexperimente das Auffinden des verantwortlichen Gens beschleunigen.

- **Mechanismus der konsekutiven Prenylierungen durch EchPT2:**

Die substratkonzentrationsabhängigen *in vitro*-Assays mit EchPT2 haben bezüglich seines Reaktionsmechanismus und in Bezug auf die genaue Funktionsweise der Substrathemmung einige Fragen aufgeworfen. Möglicherweise würde die Aufklärung der Kristallstruktur von EchPT2 im Komplex mit den Substraten weitere Erkenntnisse des Reaktionsmechanismus und der Änderung der Regiospezifität, abhängig von der Δ^{10} -Doppelbindung liefern. Um den direkten oder weiteren Umsatz zu verhindern könnten die Substrate beispielsweise an C5 oder anderer Position am Indolring mit einem Methylsubstituenten blockiert werden bzw. könnte als Cosubstrat Dimethylallyl-Thioldiphosphat (DMSP) benutzt werden. Ein Modell der EchPT2-Struktur auf Basis bekannter Strukturen von DMATS könnte möglicherweise schon zuvor hilfreiche Hinweise auf den Mechanismus geben.

Literaturverzeichnis

1. Hawksworth, D. L. & Lücking, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol. Spectr.* **5**, (2017).
2. Whittaker, R. H. New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science* **163**, 150–160 (1969).
3. Pitt, J. I. & Hocking, A. D. *Fungi and Food Spoilage*. (Springer US, 2009).
4. Eriksson, K.-E. L., Blanchette, R. & Ander, P. *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. (Springer-Verlag, 1990).
5. Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W. & Sharon, A. Plant Pathogenic Fungi. in *The Fungal Kingdom* 701–726 (John Wiley & Sons, Ltd, 2017).
6. Snyder, W. C. & Hansen, H. N. The Species Concept in *Fusarium*. *Am. J. Bot.* **27**, 64–67 (1940).
7. Schumann, G. L. & D'Arcy, C. J. *Essential plant pathology*. (American Phytopathological Society (APS Press), 2006).
8. Singh, R. P. *et al.* Will Stem Rust Destroy the World's Wheat Crop? in *Advances in Agronomy* vol. 98 271–309 (Elsevier, 2008).
9. Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K. *Phytophthora diseases worldwide*. (APS Press, 1996).
10. Dhingra, S., Buckey, J. C. & Cramer, R. A. Hyperbaric Oxygen Reduces *Aspergillus fumigatus* Proliferation In Vitro and Influences In Vivo Disease Outcomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).
11. Aliouat-Denis, C.-M. *et al.* *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infect. Genet. Evol.* **8**, 708–726 (2008).
12. Havlickova, B., Czaika, V. A. & Friedrich, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* **51**, 2–15 (2008).
13. Yapar, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther. Clin. Risk Manag.* **10**, 95–105 (2014).
14. McGovern, P. E. *et al.* Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17593–17598 (2004).
15. McGovern, P. E., Hartung, U., Badler, V. R., Glusker, D. L. & Exner, L. J. The beginnings of winemaking and viniculture in the ancient Near East and Egypt. *Expedition* **39**, 3–21 (1997).
16. Luh, B. S. Industrial production of soy sauce. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 467–471 (1995).
17. Shibasaki, K. & Hesseltine, C. W. Miso fermentation. *Econ. Bot.* **16**, 180–195 (1962).
18. Kinsella, J. E. & Hwang, D. H. Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **8**, 191–228 (1976).
19. Spinnler, H.-E. & Gripon, J.-C. Surface mould-ripened cheeses. in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (eds. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. & Guinee, T. P.) vol. 2 157–174 (Academic Press, 2004).
20. Kumar, A. *et al.* Applications of microbial technology in pulp and paper industry. in *Microbiology and Biotechnology for a Sustainable Environment* 185–206 (2017).
21. Kulshreshtha, S., Mathur, N., Bhatnagar, P. & Jain, B. L. Bioremediation of industrial waste through mushroom cultivation. *J. Environ. Biol.* **31**, 441–444 (2010).
22. Polizeli, M. de L. & Rai, M. *Fungal Enzymes*. (CRC Press, 2013).
23. Brandl, J. & Andersen, M. R. *Aspergilli*: Models for systems biology in filamentous fungi. *Curr. Opin. Syst. Biol.* **6**, 67–73 (2017).
24. Hernández, V. A., Galleguillos, F., Thibaut, R. & Müller, A. Fungal dyes for textile applications: testing of industrial conditions for wool fabrics dyeing. *J. Text. Inst.* **110**, 61–66 (2019).
25. Ostergaard, S., Olsson, L. & Nielsen, J. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 34–50 (2000).
26. Maina, U. M., Galadima, I. B., Gambo, F. M. & Zakaria, D. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *J. Entomol. Zool. Stud.* **6**, 27–32 (2018).
27. Scharf, D. H., Heinekamp, T. & Brakhage, A. A. Human and Plant Fungal Pathogens: The Role of Secondary Metabolites. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
28. Tan, S. Y. & Tatsumura, Y. Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med. J.* **56**, 366–367 (2015).
29. Harris, C. M., Roberson, J. S. & Harris, T. M. Biosynthesis of griseofulvin. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 5380–5386 (1976).
30. Alberts, A. W. Lovastatin and Simvastatin - Inhibitors of HMG CoA Reductase and Cholesterol Biosynthesis. *Cardiology* **77**, 14–21 (1990).
31. Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S. & Hoyer, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov. Today* **21**, 204–207 (2016).
32. Bryden, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim. Feed Sci. Technol.* **173**, 134–158 (2012).

33. Zain, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chem. Soc.* **15**, 129–144 (2011).
34. Eskola, M. *et al.* Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **60**, 2773–2789 (2020).
35. Kabak, B., Dobson, A. D. W. & Var, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 593–619 (2006).
36. Wild, C. P. & Gong, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* **31**, 71–82 (2010).
37. Klich, M. A., Mullaney, E. J., Daly, C. B. & Cary, J. W. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *Aspergillus tamarii* and *A. ochraceoroseus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 605–609 (2000).
38. Peterson, S. W., Ito, Y., Horn, B. W. & Goto, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* **93**, 689–703 (2001).
39. Kew, M. C. Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *J. Gastrointest. Liver Dis. JGLD* **22**, 305–310 (2013).
40. Theumer, M. G. *et al.* Genotoxicity of aflatoxins and their precursors in human cells. *Toxicol. Lett.* **287**, 100–107 (2018).
41. Stoev, S. D. & Denev, S. A. Porcine/Chicken or Human Nephropathy as the Result of Joint Mycotoxins Interaction. *Toxins* **5**, 1503–1530 (2013).
42. Riley, R. T. *et al.* Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. *Nat. Toxins* **4**, 3–15 (1996).
43. Cundliffe, E. & Davies, J. E. Inhibition of Initiation, Elongation, and Termination of Eukaryotic Protein Synthesis by Trichothecene Fungal Toxins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**, 491–499 (1977).
44. Cole, R. J., Schweikert, M. A. & Jarvis, B. B. *Handbook of secondary fungal metabolites*. vol. 3 (Academic Press, 2003).
45. Téren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E. & Kevei, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* **134**, 171–176 (1996).
46. Kuiper-Goodman, T. & Scott, P. M. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci. BES* **2**, 179–248 (1989).
47. Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M. & Watanabe, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **7**, 253–306 (1987).
48. Reddy, P. *et al.* Tremorgenic Mycotoxins: Structure Diversity and Biological Activity. *Toxins* **11**, (2019).
49. Fabian, S. J., Maust, M. D. & Panaccione, D. G. Ergot Alkaloid Synthesis Capacity of *Penicillium camemberti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, (2018).
50. Panaccione, D. G. & Coyle, C. M. Abundant Respirable Ergot Alkaloids from the Common Airborne Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3106–3111 (2005).
51. Young, C. A. *et al.* Genetics, Genomics and Evolution of Ergot Alkaloid Diversity. *Toxins* **7**, 1273–1302 (2015).
52. Hussein, H. S. & Brasel, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167**, 101–134 (2001).
53. Vogel, J. P., Williams, M., Gallos, I., Althabe, F. & Oladapo, O. T. WHO recommendations on uterotonics for post-partum haemorrhage prevention: what works, and which one? *BMJ Glob. Health* **4**, (2019).
54. Tfelt-Hansen, P. & Koehler, P. History of the Use of Ergotamine and Dihydroergotamine in Migraine From 1906 and Onward. *Cephalalgia* **28**, 877–886 (2008).
55. Holt, R. I. G., Barnett, A. H. & Bailey, C. J. Bromocriptine: old drug, new formulation and new indication. *Diabetes Obes. Metab.* **12**, 1048–1057 (2010).
56. Michelot, D. & Melendez-Howell, L. M. *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycol. Res.* **107**, 131–146 (2003).
57. Nyberg, H. Religious use of hallucinogenic fungi: A comparison between Siberian and Mesoamerican cultures. *Karstenia* **32**, 71–80 (1992).
58. Winkelman, M. Introduction: Evidence for entheogen use in prehistory and world religions. *J. Psychedelic Stud.* **3**, 43–62 (2019).
59. Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. & Stalpers, J. A. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. (CABI Publishing, 2010).
60. Lumbsch, T. H. & Huhndorf, S. M. Outline of Ascomycota - 2007. in *Myconet* vol. 13 1–58 (Myconet, 2007).
61. Moore, D., Robson, G. D. & Trinci, A. P. J. *21st century guidebook to fungi*. (Cambridge University Press, 2011).
62. Bennett, R. J. & Turgeon, B. G. Fungal Sex: The Ascomycota. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
63. Houbraken, J. *et al.* Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud. Mycol.* **95**, 5–169 (2020).

64. König, J., Spieckermann & Bremer, W. *Eurotium rubrum*. Z. Für Unters. Nahr.- Genußmittel Sowie Gebrauchsgegenstände 726 (1901).
65. Chen, X. et al. Neoechinulin B and its analogues as potential entry inhibitors of influenza viruses, targeting viral hemagglutinin. *Eur. J. Med. Chem.* **93**, 182–195 (2015).
66. Kis-Papo, T. et al. Genomic adaptations of the halophilic Dead Sea filamentous fungus *Eurotium rubrum*. *Nat. Commun.* **5**, 3745 (2014).
67. Li, D.-L., Li, X.-M., Li, T.-G., Dang, H.-Y. & Wang, B.-G. Dioxopiperazine Alkaloids Produced by the Marine Mangrove Derived Endophytic Fungus *Eurotium rubrum*. *Helv. Chim. Acta* **91**, 1888–1893 (2008).
68. Meng, L.-H. et al. Rubrumazines A–C, Indoleketopiperazines of the Isoechinulin Class from *Eurotium rubrum* MA-150, a Fungus Obtained from Marine Mangrove-Derived Rhizospheric Soil. *J. Nat. Prod.* **78**, 909–913 (2015).
69. Pitt, J. I. et al. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 35–53 (1994).
70. Pitt, J. I. et al. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 1. nuts and oilseeds. *Int. J. Food Microbiol.* **20**, 211–226 (1993).
71. Qiao, M.-F., Yi, Y.-W. & Deng, J. Steroids from an Endophytic *Eurotium rubrum* Strain. *Chem. Nat. Compd.* **53**, 678–681 (2017).
72. Takenaka, S. et al. Characterization of surface *Aspergillus* community involved in traditional fermentation and ripening of katsuobushi. *Int. J. Food Microbiol.* **327**, 108654 (2020).
73. Hong, S.-B., Kim, D.-H. & Samson, R. A. *Aspergillus* Associated with *Meju*, a Fermented Soybean Starting Material for Traditional Soy Sauce and Soybean Paste in Korea. *Mycobiology* **43**, 218–224 (2015).
74. Youssef, F. S. & Singab, A. N. B. An Updated Review on the Secondary Metabolites and Biological Activities of *Aspergillus ruber* and *Aspergillus flavus* and Exploring the Cytotoxic Potential of Their Isolated Compounds Using Virtual Screening. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2021**, e8860784 (2021).
75. Engstrom, G. W., Stenkamp, R. E., McDorman, D. J. & Jensen, L. H. Spectral identification, x-ray structure determination and iron-chelating capability of erythroglaucon, a red pigment from *Aspergillus ruber*. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 304–307 (1982).
76. Zhang, Y. et al. Anthraquinones from the saline-alkali plant endophytic fungus *Eurotium rubrum*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **70**, 1138–1141 (2017).
77. Liu, Z. et al. Eurothiocin A and B, Sulfur-Containing Benzofurans from a Soft Coral-Derived Fungus *Eurotium rubrum* SH-823. *Mar. Drugs* **12**, 3669–3680 (2014).
78. Meng, L.-H. et al. Isolation, Stereochemical Study, and Antioxidant Activity of Benzofuranone Derivatives from a Mangrove-derived Fungus *Eurotium rubrum* MA-150. *Chirality* **28**, 581–584 (2016).
79. Slack, G. J., Puniani, E., Frisvad, J. C., Samson, R. A. & Miller, J. D. Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *Mycol. Res.* **113**, 480–490 (2009).
80. *Fungal Metabolites*. (Springer International Publishing, 2017).
81. Ge, Y. et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses of the Fuzhuan brick tea-fermentation fungus *Aspergillus cristatus*. *BMC Genomics* **17**, 428 (2016).
82. Bandapalli, O. et al. Identification and Characterization of Biosynthetic Gene Clusters from Halophilic Marine Fungus *Eurotium rubrum*. (2020).
83. Gould, B. S. & Raistrick, H. Studies in the biochemistry of micro-organisms - The crystalline pigments of species in the *Aspergillus glaucus* series. *Biochem. J.* **28**, 1640–1656 (1934).
84. Quilico, A. & Panizzi, L. Chemische Untersuchungen über *Aspergillus echinulatus*, I. Mitteilung. *Berichte Dtsch. Chem. Ges. B Ser.* **76**, 348–358 (1943).
85. Panizzi, L. & Nicolaus, R. Chemical investigations of the *Aspergillus glaucus* group. IX. The structure of flavoglauconine. Its degradation and the synthesis of its dihydro derivative. *Gazzetta Chim. Ital.* **83**, 774–781 (1953).
86. Quilico, A., Cardani, C. & Panizzi, L. Structure of flavoglauconine. *Atti Accad Nazl Lincei Rend Cl. Sci Fis Mat E Nat* **14**, 358–364 (1953).
87. Quilico, A., Cardani, C. & Lucattelli, I. Chemical studies of the *Aspergillus glaucus* group. X. The structure of flavoglauconine. The ultraviolet and infrared spectra and chromatic reactions of hydroquinonic aldehydes. *Gazzetta Chim. Ital.* **83**, 1088–1105 (1953).
88. Quilico, A., Cardani, C. & d'Alcontres, G. S. Chemical investigations of the *Aspergillus glaucus* group. VIII. The structure of flavoglauconine. Degradation products with hydrogen peroxide and an alkali. *Gazzetta Chim. Ital.* **83**, 754–773 (1953).
89. Quilico, A., Panizzi, L. & Mugnaini, E. Structure of flavoglauconine and auroglauconine. *Nature* **164**, 26 (1949).
90. Hamasaki, T., Kimura, Y., Hatsuda, Y. & Nagao, M. Structure of a New Metabolite, Dihydroauroglauconine, Produced by *Aspergillus chevalieri*. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 313–314 (1981).

91. Hamasaki, T., Fukunaga, M., Kimura, Y. & Hatsuda, Y. Isolation and Structures of Two New Metabolites from *Aspergillus ruber*. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 1685–1687 (1980).
92. Li, D.-L. *et al.* Benzaldehyde Derivatives from *Eurotium rubrum*, an Endophytic Fungus Derived from the Mangrove Plant *Hibiscus tiliaceus*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **56**, 1282–1285 (2008).
93. Cho, J. Y. & Kim, M. S. Antibacterial benzaldehydes produced by seaweed-derived *Streptomyces atrovirens* PK288-21. *Fish. Sci.* **78**, 1065–1073 (2012).
94. Yoshihira, K., Takahashi, C., Sekita(sakaki), S. & Natori, S. Tetrahydroauroglaucin from *Penicillium charlesii*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **20**, 2727–2728 (1972).
95. Gu, Y., Leng, A., Zhang, W., Ying, X. & Stien, D. A novel alkaloid from *Portulaca oleracea* L. and its anti-inflammatory activity. *Nat. Prod. Res.* **0**, 1–6 (2020).
96. Shi, Y.-N. *et al.* Chemical constituents from *Piper wallichii*. *Nat. Prod. Res.* **29**, 1372–1375 (2015).
97. Yang, Y. *et al.* Rapid Identification of α -Glucosidase Inhibitors from *Phlomis tuberosa* by Sepbox Chromatography and Thin-Layer Chromatography Bioautography. *PLOS ONE* **10**, e0116922 (2015).
98. Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *J. Nat. Prod.* **67**, 257–268 (2004).
99. Du, F.-Y., Li, X.-M., Li, C.-S., Shang, Z. & Wang, B.-G. Cristatamins A–D, new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 4650–4653 (2012).
100. Li, X.-J., Zhang, Q., Zhang, A.-L. & Gao, J.-M. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an Endophytic Fungus Associated with *Melia azedarach*, and Their Antifungal, Antifeedant, and Toxic Activities. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 3424–3431 (2012).
101. Birch, A. J., Ryan, A. J., Schofield, J. & Smith, H. 216. Studies in relation to biosynthesis. Part XXXVII. Some structures derived from acetic acid by two pathways. *J. Chem. Soc. Resumed* 1231–1234 (1965).
102. Zhang, P. *et al.* Anti-inflammatory prenylbenzaldehyde derivatives isolated from *Eurotium cristatum*. *Phytochemistry* **158**, 120–125 (2019).
103. Miyake, Y., Ito, C., Itoigawa, M. & Osawa, T. Antioxidants Produced by *Eurotium herbariorum* of Filamentous Fungi Used for the Manufacture of Karebushi, Dried Bonito (Katsubushi). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1323–1327 (2009).
104. Miyake, Y., Ito, C., Tokuda, H., Osawa, T. & Itoigawa, M. Evaluation of flavoglucan, its derivatives and pyranonigrins produced by molds used in fermented foods for inhibiting tumor promotion. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 1120–1122 (2010).
105. Liang, T.-M., Fang, Y.-W., Zheng, J.-Y. & Shao, C.-L. Secondary Metabolites Isolated from the Gorgonian-Derived Fungus *Aspergillus ruber* and Their Antiviral Activity. *Chem. Nat. Compd.* **54**, 559–561 (2018).
106. Gao, J. *et al.* Benzyl Derivatives with in Vitro Binding Affinity for Human Opioid and Cannabinoid Receptors from the Fungus *Eurotium repens*. *J. Nat. Prod.* **74**, 1636–1639 (2011).
107. Casnati, G., Cavalleri, R., Piozzi, F. & Quilico, A. *Aspergillus glaucus* group XVII. Echinuline. 11. *Gazzetta Chim. Ital.* **92**, 105–128 (1962).
108. Nakashima, R. & Slater, O. P. The configuration of echinulin. *Tetrahedron Lett.* **8**, 4433–4436 (1967).
109. Romanet, R., Chemizart, A., Duhoux, S. & David, S. Structure of echinuline. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1048–1056 (1963).
110. Ma, Y.-M., Liang, X.-A., Kong, Y. & Jia, B. Structural Diversity and Biological Activities of Indole Diketopiperazine Alkaloids from Fungi. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 6659–6671 (2016).
111. Talapatra, S. K. *et al.* Echinulin, a Novel Cyclic Dipeptide Carrying a Triprenylated Indole Moiety from an Anacardiaceae, a Cucurbitaceae and Two Orchidaceae Plants: Detailed High Resolution 2D-NMR and Mass Spectral Studies. *ChemInform* **34**, (2003).
112. Kim, K.-S. *et al.* Anti-Inflammatory Effect of Neoechinulin A from the Marine Fungus *Eurotium* sp. SF-5989 through the Suppression of NF- κ B and p38 MAPK Pathways in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Macrophages. *Molecules* **18**, 13245–13259 (2013).
113. Li, Y. *et al.* Golmaenone, a New Diketopiperazine Alkaloid from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **52**, 375–376 (2004).
114. Wang, W.-L. *et al.* Isoechinulin-type Alkaloids, Variecolorins A–L, from Halotolerant *Aspergillus variecolor*. *J. Nat. Prod.* **70**, 1558–1564 (2007).
115. Nakajima, S. *et al.* Fungus-Derived Neoechinulin B as a Novel Antagonist of Liver X Receptor, Identified by Chemical Genetics Using a Hepatitis C Virus Cell Culture System. *J. Virol.* **90**, 9058–9074 (2016).
116. Fujimoto, H., Fujimaki, T., Okuyama, E. & Yamazaki, M. Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **47**, 1426–1432 (1999).
117. Kimoto, K. *et al.* Structure-activity relationships of neoechinulin A analogues with cytoprotection against peroxynitrite-induced PC12 cell death. *J. Antibiot. (Tokyo)* **60**, 614–621 (2007).

118. Wohlgemuth, V., Kindinger, F., Xie, X., Wang, B.-G. & Li, S.-M. Two Prenyltransferases Govern a Consecutive Prenylation Cascade in the Biosynthesis of Echinulin and Neoechinulin. *Org. Lett.* **19**, 5928–5931 (2017).
119. Gatti, G., Cardillo, R., Fuganti, C. & Ghiringhelli, D. Structure determination of two extractives from *Aspergillus amstelodami* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 435–436 (1976).
120. Ran, H. & Li, S.-M. Fungal benzene carbaldehydes: occurrence, structural diversity, activities and biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* (2020).
121. Zhong, W. *et al.* Three Pairs of New Spirocyclic Alkaloid Enantiomers From the Marine-Derived Fungus *Eurotium* sp. SCSIO F452. *Front. Chem.* **7**, (2019).
122. Gao, H. *et al.* Diketopiperazine alkaloids from a mangrove rhizosphere soil derived fungus *Aspergillus effuses* H1-1. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 9501–9506 (2012).
123. Wang, W.-L. *et al.* Three Novel, Structurally Unique Spirocyclic Alkaloids from the Halotolerant B-17 Fungal Strain of *Aspergillus varicolor*. *Chem. Biodivers.* **4**, 2913–2919 (2007).
124. Li, D.-L., Li, X.-M., Proksch, P. & Wang, B.-G. 7-O-Methylvaricolorotide A, a new spirocyclic diketopiperazine alkaloid from a marine mangrove derived endophytic fungus, *Eurotium rubrum*. *Nat. Prod. Commun.* **5**, 1583–1586 (2010).
125. Chen, G.-D. *et al.* Three pairs of varicolorotide enantiomers from *Eurotium* sp. with caspase-3 inhibitory activity. *Fitoterapia* **92**, 252–259 (2014).
126. Brakhage, A. A. & Schroeckh, V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet. Biol.* **48**, 15–22 (2011).
127. Keller, N. P., Turner, G. & Bennett, J. W. Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 937–947 (2005).
128. Kück, U., Bloemendal, S. & Teichert, I. Putting Fungi to Work: Harvesting a Cornucopia of Drugs, Toxins, and Antibiotics. *PLoS Pathog.* **10**, (2014).
129. Keller, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 167–180 (2019).
130. Nielsen, J. C. & Nielsen, J. Development of fungal cell factories for the production of secondary metabolites: Linking genomics and metabolism. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2**, 5–12 (2017).
131. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79**, 629–661 (2016).
132. Keller, N. P. & Hohn, T. M. Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Fungal Genet. Biol.* **21**, 17–29 (1997).
133. Cary, J. W., Chang, P.-K. & Bhatnagar, D. Clustered metabolic pathway genes in filamentous fungi. in *Applied Mycology and Biotechnology* (eds. Khachatourians, G. G. & Arora, D. K.) vol. 1 165–198 (Elsevier, 2001).
134. Rokas, A., E. Mead, M., L. Steenwyk, J., A. Raja, H. & H. Oberlies, N. Biosynthetic gene clusters and the evolution of fungal chemodiversity. *Nat. Prod. Rep.* **37**, 868–878 (2020).
135. Rokas, A., Wisecaver, J. H. & Lind, A. L. The birth, evolution and death of metabolic gene clusters in fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 731–744 (2018).
136. Koonin, E. V. Evolution of Genome Architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 298–306 (2009).
137. Yue, Q. *et al.* Functional Operons in Secondary Metabolic Gene Clusters in *Glarea lozoyensis* (Fungi, Ascomycota, Leotiomycetes). *mBio* **6**, (2015).
138. Nützmann, H.-W. & Osbourn, A. Gene clustering in plant specialized metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* **26**, 91–99 (2014).
139. Alberti, F., Foster, G. D. & Bailey, A. M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 493–500 (2017).
140. Fleischmann, R. D. *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**, 496–512 (1995).
141. Perbal, L. The case of the gene. *EMBO Rep.* **16**, 777–781 (2015).
142. Mardis, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet. TIG* **24**, 133–141 (2008).
143. Scazzocchio, C. Fungal biology in the post-genomic era. *Fungal Biol. Biotechnol.* **1**, 7 (2014).
144. Aogáin, M. M., Chaturvedi, V. & Chotirmall, S. H. MycopathologiaGENOMES: The New ‘Home’ for the Publication of Fungal Genomes. *Mycopathologia* **184**, 551–554 (2019).
145. Butler, G. *et al.* Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**, 657–662 (2009).
146. de Vries, R. P. *et al.* Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol.* **18**, (2017).
147. Kjærboelling, I., Vesth, T. & Andersen, M. R. Resistance Gene-Directed Genome Mining of 50 *Aspergillus* Species. *mSystems* **4**, (2019).

148. Khaldi, N. *et al.* SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet. Biol. FG B* **47**, 736–741 (2010).
149. Medema, M. H. *et al.* AntiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* **39**, W339–W346 (2011).
150. Ziemert, N., Alanjary, M. & Weber, T. The evolution of genome mining in microbes – a review. *Nat. Prod. Rep.* **33**, 988–1005 (2016).
151. Galagan, J. E. *et al.* Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105–1115 (2005).
152. Baltz, R. H. Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 573–588 (2017).
153. Brakhage, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 21–32 (2013).
154. Begani, J., Lakhani, J. & Harwani, D. Current strategies to induce secondary metabolites from microbial biosynthetic cryptic gene clusters. *Ann. Microbiol.* **68**, 419–432 (2018).
155. Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R. & Zeeck, A. Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature’s Chemical Diversity. *ChemBioChem* **3**, 619–627 (2002).
156. Pan, R., Bai, X., Chen, J., Zhang, H. & Wang, H. Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
157. Abdelwahab, M. F. *et al.* Induced secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* through bacterial co-culture and OSMAC approaches. *Tetrahedron Lett.* **59**, 2647–2652 (2018).
158. Daletos, G. *et al.* Microbial Coculture and OSMAC Approach as Strategies to Induce Cryptic Fungal Biogenetic Gene Clusters. in *Chemical Biology of Natural Products* 233–284 (CRC Press, 2017).
159. Akone, S. H. *et al.* Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Chaetomium* sp. through fungal–bacterial co-culture and epigenetic modification. *Tetrahedron* **72**, 6340–6347 (2016).
160. Brown, D. W. *et al.* Identification of a 12-gene Fusaric Acid Biosynthetic Gene Cluster in *Fusarium* Species Through Comparative and Functional Genomics. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **28**, 319–332 (2015).
161. Yin, W.-B. *et al.* A Nonribosomal Peptide Synthetase-Derived Iron(III) Complex from the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 2064–2067 (2013).
162. Bergmann, S. *et al.* Activation of a Silent Fungal Polyketide Biosynthesis Pathway through Regulatory Cross Talk with a Cryptic Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 8143–8149 (2010).
163. Wiemann, P. *et al.* Perturbations in small molecule synthesis uncovers an iron-responsive secondary metabolite network in *Aspergillus fumigatus*. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
164. Macheleidt, J. *et al.* Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annu. Rev. Genet.* **50**, 371–392 (2016).
165. Bayram, O. & Braus, G. H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 1–24 (2012).
166. Bok, J. W. & Keller, N. P. LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* **3**, 527–535 (2004).
167. Bergmann, S. *et al.* Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 213–217 (2007).
168. Bromann, K. *et al.* Identification and Characterization of a Novel Diterpene Gene Cluster in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* **7**, (2012).
169. Chiang, Y.-M. *et al.* Characterization of the *Aspergillus nidulans* Monodictyphenone Gene Cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2067–2074 (2010).
170. Chiang, Y.-M. *et al.* A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2965–2970 (2009).
171. Wiemann, P. & Keller, N. P. Strategies for mining fungal natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 301–313 (2014).
172. Sterner, D. E., Nathan, D., Reindle, A., Johnson, E. S. & Berger, S. L. Sumoylation of the Yeast Gcn5 Protein. *Biochemistry* **45**, 1035–1042 (2006).
173. Trujillo, K. M., Tyler, R. K., Ye, C., Berger, S. L. & Osley, M. A. A genetic and molecular toolbox for analyzing histone ubiquitylation and sumoylation in yeast. *Methods San Diego Calif* **54**, 296–303 (2011).
174. Bok, J. W. *et al.* Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 462–464 (2009).
175. Sanchez, J. F. *et al.* Genome-Based Deletion Analysis Reveals the Prenyl Xanthone Biosynthesis Pathway in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 4010–4017 (2011).
176. Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Joyner, P. M. & Cichewicz, R. H. A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 435–438 (2009).
177. Chai, Y.-J. *et al.* Activation of the Dormant Secondary Metabolite Production by Introducing Gentamicin-Resistance in a Marine-Derived *Penicillium purpurogenum* G59. *Mar. Drugs* **10**, 559–582 (2012).

178. Ochi, K. *et al.* Ribosome Engineering and Secondary Metabolite Production. in *Advances in Applied Microbiology* vol. 56 155–184 (Academic Press, 2004).
179. Gross, H. *et al.* The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chem. Biol.* **14**, 53–63 (2007).
180. Kinzel, R. B. *et al.* A Maldiisotopic Approach to Discover Natural Products: Cryptomaldamide, a Hybrid Tripeptide from the Marine Cyanobacterium *Moorea producula*. *J. Nat. Prod.* **80**, 1514–1521 (2017).
181. May, D. S. *et al.* ¹⁵N Stable Isotope Labeling and Comparative Metabolomics Facilitates Genome Mining in Cultured Cyanobacteria. *ACS Chem. Biol.* **15**, 758–765 (2020).
182. Theobald, S. *et al.* Uncovering secondary metabolite evolution and biosynthesis using gene cluster networks and genetic dereplication. *Sci. Rep.* **8**, 17957 (2018).
183. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D'Ari, R. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol.* **189**, 8746–8749 (2007).
184. Choi, J. H., Keum, K. C. & Lee, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Sci.* **61**, 876–885 (2006).
185. Peti, W. & Page, R. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expr. Purif.* **51**, 1–10 (2007).
186. Gräslund, S. *et al.* Protein production and purification. *Nat. Methods* **5**, 135–146 (2008).
187. Huo, L. *et al.* Heterologous expression of bacterial natural product biosynthetic pathways. *Nat. Prod. Rep.* **36**, 1412–1436 (2019).
188. Zhang, J. J., Tang, X. & Moore, B. S. Genetic platforms for heterologous expression of microbial natural products. *Nat. Prod. Rep.* **36**, 1313–1332 (2019).
189. Jacobus, A. P. & Gross, J. Optimal Cloning of PCR Fragments by Homologous Recombination in *Escherichia coli*. *PLOS ONE* **10**, e0119221 (2015).
190. Kevin R., O., Vo, K. T., Michaelis, S. & Paddon, C. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. *Nucleic Acids Res.* **25**, 451–452 (1997).
191. Zhang, J. J., Tang, X., Zhang, M., Nguyen, D. & Moore, B. S. Broad-Host-Range Expression Reveals Native and Host Regulatory Elements That Influence Heterologous Antibiotic Production in Gram-Negative Bacteria. *mBio* **8**, (2017).
192. Zhang, H., Boghigian, B. A., Armando, J. & Pfeifer, B. A. Methods and options for the heterologous production of complex natural products. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 125–151 (2011).
193. Fujii, R. *et al.* Total biosynthesis of diterpene aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerase α : heterologous expression of four biosynthetic genes in *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1813–1817 (2011).
194. Heneghan, M. N. *et al.* First heterologous reconstruction of a complete functional fungal biosynthetic multigene cluster. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **11**, 1508–1512 (2010).
195. Marui, J. *et al.* Penicillin biosynthesis in *Aspergillus oryzae* and its overproduction by genetic engineering. *J. Biosci. Bioeng.* **110**, 8–11 (2010).
196. Itoh, T., Kushiro, T. & Fujii, I. Reconstitution of a secondary metabolite biosynthetic pathway in a heterologous fungal host. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **944**, 175–182 (2012).
197. Hertweck, C. Die biosynthetische Grundlage der Polyketid-Vielfalt. *Angew. Chem.* **121**, 4782–4811 (2009).
198. Weissman, K. J. Introduction to Polyketide Biosynthesis. in *Complex Enzymes in Microbial Natural Product Biosynthesis, Part B: Polyketides, Aminocoumarins and Carbohydrates* vol. 459 3–16 (Academic Press, 2009).
199. Korman, T. P., Ames, B. & (Sheryl) Tsai, S.-C. 1.08 - Structural Enzymology of Polyketide Synthase: The Structure–Sequence–Function Correlation. in *Comprehensive Natural Products II* (eds. Liu, H.-W. (Ben) & Mander, L.) 305–345 (Elsevier, 2010).
200. Birch, A. J. & Donovan, F. W. Studies in relation to Biosynthesis. I. Some possible routes to derivatives of Orcinol and Phloroglucinol. *Aust. J. Chem.* **6**, 360–368 (1953).
201. Cox, R. J., Skellam, E. & Williams, K. Biosynthesis of Fungal Polyketides. in *Physiology and Genetics: Selected Basic and Applied Aspects* (eds. Anke, T. & Schöffler, A.) 385–412 (Springer International Publishing, 2018).
202. Miyanaga, A. Structure and function of polyketide biosynthetic enzymes: various strategies for production of structurally diverse polyketides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**, 2227–2236 (2017).
203. Moss, S. J., Martin, C. J. & Wilkinson, B. Loss of co-linearity by modular polyketide synthases: a mechanism for the evolution of chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* **21**, 575–593 (2004).
204. Müller, R. Don't Classify Polyketide Synthases. *Chem. Biol.* **11**, 4–6 (2004).
205. Shen, B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 285–295 (2003).
206. Wenzel, S. C. & Müller, R. Formation of novel secondary metabolites by bacterial multimodular assembly lines: deviations from textbook biosynthetic logic. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 447–458 (2005).

207. Fisch, K. M. Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS–NRPS. *RSC Adv.* **3**, 18228–18247 (2013).
208. Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms. *Chem. Rev.* **106**, 3468–3496 (2006).
209. Cane, D. E., Walsh, C. T. & Khosla, C. Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**, 63–68 (1998).
210. Klaus, M. & Grninger, M. Engineering strategies for rational polyketide synthase design. *Nat. Prod. Rep.* **35**, 1070–1081 (2018).
211. Piel, J. Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 996–1047 (2010).
212. Rawlings, B. J. Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A—erythromycin biosynthesis). *Nat. Prod. Rep.* **18**, 190–227 (2001).
213. Edwards, A. L., Matsui, T., Weiss, T. M. & Khosla, C. Architectures of Whole-Module and Bimodular Proteins from the 6-Deoxyerythronolide B Synthase. *J. Mol. Biol.* **426**, 2229–2245 (2014).
214. Chooi, Y.-H. & Tang, Y. Navigating the Fungal Polyketide Chemical Space: From Genes to Molecules. *J. Org. Chem.* **77**, 9933–9953 (2012).
215. Winter, J. M. *et al.* Identification and Characterization of the Chaetoviridin and Chaetomugilin Gene Cluster in *Chaetomium globosum* Reveal Dual Functions of an Iterative Highly-Reducing Polyketide Synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 17900–17903 (2012).
216. Crawford, J. M., Dancy, B. C. R., Hill, E. A., Udway, D. W. & Townsend, C. A. Identification of a starter unit acyl-carrier protein transacylase domain in an iterative type I polyketide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16728–16733 (2006).
217. Cox, R. J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 2010–2026 (2007).
218. Korman, T. P. *et al.* Structure and function of an iterative polyketide synthase thioesterase domain catalyzing Claisen cyclization in aflatoxin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 6246–6251 (2010).
219. Fujii, I., Watanabe, A., Sankawa, U. & Ebizuka, Y. Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chem. Biol.* **8**, 189–197 (2001).
220. Awakawa, T. *et al.* Physically Discrete β -Lactamase-Type Thioesterase Catalyzes Product Release in Atrochrysone Synthesis by Iterative Type I Polyketide Synthase. *Chem. Biol.* **16**, 613–623 (2009).
221. Bailey, A. M. *et al.* Characterisation of 3-methylorcinolaldehyde synthase (MOS) in *Acremonium strictum*: first observation of a reductive release mechanism during polyketide biosynthesis. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 4053–4055 (2007).
222. Storm, P. A., Herbst, D. A., Maier, T. & Townsend, C. A. Functional and Structural Analysis of Programmed C-Methylation in the Biosynthesis of the Fungal Polyketide Citrinin. *Cell Chem. Biol.* **24**, 316–325 (2017).
223. Kage, H. *et al.* Chemical chain termination resolves the timing of ketoreduction in a partially reducing iterative type I polyketide synthase. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 11414–11417 (2015).
224. Sthapit, B. *et al.* Neocarzinostatin naphthoate synthase: an unique iterative type I PKS from neocarzinostatin producer *Streptomyces carzinostaticus*. *FEBS Lett.* **566**, 201–206 (2004).
225. Zhao, Q. *et al.* Characterization of the azinomycin B biosynthetic gene cluster revealing a different iterative type I polyketide synthase for naphthoate biosynthesis. *Chem. Biol.* **15**, 693–705 (2008).
226. Sun, H. *et al.* Synthesis of (R)-mellein by a partially reducing iterative polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11924–11927 (2012).
227. Holm, D. K. *et al.* Molecular and Chemical Characterization of the Biosynthesis of the 6-MSA-Derived Meroterpenoid Yanuthone D in *Aspergillus niger*. *Chem. Biol.* **21**, 519–529 (2014).
228. Kong, C. *et al.* Heterologous pathway assembly reveals molecular steps of fungal terreic acid biosynthesis. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
229. Puel, O., Galtier, P. & Oswald, I. P. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins* **2**, 613–631 (2010).
230. Ugai, T. *et al.* Heterologous expression of highly reducing polyketide synthase involved in betaenone biosynthesis. *Chem. Commun.* **51**, 1878–1881 (2015).
231. Ma, S. M. *et al.* Complete Reconstitution of a Highly Reducing Iterative Polyketide Synthase. *Science* **326**, 589–592 (2009).
232. Maier, T., Leibundgut, M. & Ban, N. The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. *Science* **321**, 1315–1322 (2008).
233. Hamilton, R. J. Fatty Acids: Structure, Occurrence, Nomenclature, Biosynthesis and Properties. in *Trans Fatty Acids* 1–24 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008).
234. Tsunematsu, Y. *et al.* Elucidation of Pseurotin Biosynthetic Pathway Points to Trans-Acting C-Methyltransferase: Generation of Chemical Diversity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 8475–8479 (2014).

235. Chakravarty, B., Gu, Z., Chirala, S. S., Wakil, S. J. & Quiocho, F. A. Human fatty acid synthase: Structure and substrate selectivity of the thioesterase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 15567–15572 (2004).
236. Harvey, C. J. B. *et al.* HEx: A heterologous expression platform for the discovery of fungal natural products. *Sci. Adv.* **4**, eaar5459 (2018).
237. Xu, W. *et al.* LovG: The Thioesterase Required for Dihydromonacolin L Release and Lovastatin Nonaketide Synthase Turnover in Lovastatin Biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 6472–6475 (2013).
238. Zabala, A. O., Chooi, Y.-H., Choi, M. S., Lin, H.-C. & Tang, Y. Fungal Polyketide Synthase Product Chain-Length Control by Partnering Thiohydrolase. *ACS Chem. Biol.* **9**, 1576–1586 (2014).
239. Liu, N. *et al.* Identification and Heterologous Production of a Benzoyl-Primed Tricarboxylic Acid Polyketide Intermediate from the Zaragozic Acid A Biosynthetic Pathway. *Org. Lett.* **19**, 3560–3563 (2017).
240. Xie, X., Meehan, M. J., Xu, W., Dorrestein, P. C. & Tang, Y. Acyltransferase Mediated Polyketide Release from a Fungal Megasyntase. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 8388–8389 (2009).
241. Kim, Y.-T. *et al.* Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Mol. Microbiol.* **58**, 1102–1113 (2005).
242. Zhou, H. *et al.* Enzymatic Synthesis of Resorcylic Acid Lactones by Cooperation of Fungal Iterative Polyketide Synthases Involved in Hypothemycin Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 4530–4531 (2010).
243. Zhou, H., Zhan, J., Watanabe, K., Xie, X. & Tang, Y. A polyketide macrolactone synthase from the filamentous fungus *Gibberella zeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 6249–6254 (2008).
244. Liu, L., Tang, M.-C. & Tang, Y. Fungal Highly Reducing Polyketide Synthases Biosynthesize Salicylaldehydes That Are Precursors to Epoxycyclohexenol Natural Products. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 19538–19541 (2019).
245. Wang, J. *et al.* Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases. *Microb. Cell Factories* **19**, 110 (2020).
246. Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y. & Bechthold, A. Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 162–190 (2007).
247. Frederick, C. A. *et al.* Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* **29**, 2538–2549 (1990).
248. Chopra, I. & Roberts, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260 (2001).
249. Rabbani, A., Finn, R. M. & Ausió, J. The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *BioEssays* **27**, 50–56 (2005).
250. Bisang, C. *et al.* A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature* **401**, 502–505 (1999).
251. McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A. & Khosla, C. Engineered biosynthesis of novel polyketides: manipulation and analysis of an aromatic polyketide synthase with unproven catalytic specificities. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11671–11675 (1993).
252. Bao, W., Wendt-Pienkowski, E. & Hutchinson, C. R. Reconstitution of the Iterative Type II Polyketide Synthase for Tetracenomycin F2 Biosynthesis. *Biochemistry* **37**, 8132–8138 (1998).
253. Florova, G., Kazanina, G. & Reynolds, K. A. Enzymes Involved in Fatty Acid and Polyketide Biosynthesis in *Streptomyces glaucescens*: Role of FabH and FabD and Their Acyl Carrier Protein Specificity. *Biochemistry* **41**, 10462–10471 (2002).
254. Arthur, C. J. *et al.* Self-Malonylation Is an Intrinsic Property of a Chemically Synthesized Type II Polyketide Synthase Acyl Carrier Protein. *Biochemistry* **44**, 15414–15421 (2005).
255. Risdian, C., Mozef, T. & Wink, J. Biosynthesis of Polyketides in *Streptomyces*. *Microorganisms* **7**, 124 (2019).
256. Austin, M. B. & Noel, J. P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 79–110 (2003).
257. Funa, N. *et al.* A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature* **400**, 897–899 (1999).
258. Navarro-Muñoz, J. C. & Collemare, J. Evolutionary Histories of Type III Polyketide Synthases in Fungi. *Front. Microbiol.* **10**, (2020).
259. Seshime, Y., Juvvadi, P. R., Fujii, I. & Kitamoto, K. Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 253–260 (2005).
260. Katsuyama, Y. & Horinouchi, S. 1.05 - Microbial Type III Polyketide Synthases. in *Comprehensive Natural Products II* (eds. Liu, H.-W. (Ben) & Mander, L.) 147–170 (Elsevier, 2010).
261. Lim, Y. P., Go, M. K. & Yew, W. S. Exploiting the Biosynthetic Potential of Type III Polyketide Synthases. *Molecules* **21**, (2016).
262. Shimizu, Y., Ogata, H. & Goto, S. Type III Polyketide Synthases: Functional Classification and Phylogenomics. *ChemBioChem* **18**, 50–65 (2017).

263. Jeya, M. *et al.* The *Botrytis cinerea* type III polyketide synthase shows unprecedented high catalytic efficiency toward long chain acyl-CoAs. *Mol. Biosyst.* **8**, 2864–2867 (2012).
264. Manoharan, G. *et al.* Identification and characterization of type III polyketide synthase genes from culturable endophytes of ethnomedicinal plants. *Enzyme Microb. Technol.* **131**, 109396 (2019).
265. Rubin-Pitel, S. B. *et al.* Distinct Structural Elements Dictate the Specificity of the Type III Pentaketide Synthase from *Neurospora crassa*. *Chem. Biol.* **15**, 1079–1090 (2008).
266. Funai, N., Awakawa, T. & Horinouchi, S. Pentaketide Resorcylic Acid Synthesis by Type III Polyketide Synthase from *Neurospora crassa**. *J. Biol. Chem.* **282**, 14476–14481 (2007).
267. Flores-Sanchez, I. J. & Verpoorte, R. Plant Polyketide Synthases: A fascinating group of enzymes. *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 167–174 (2009).
268. Walsh, C. T., O'Brien, R. V. & Khosla, C. Nonproteinogenic Amino Acid Building Blocks for Nonribosomal Peptide and Hybrid Polyketide Scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **52**, 7098–7124 (2013).
269. Konz, D., Klens, A., Schörgendorfer, K. & Marahiel, M. A. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem. Biol.* **4**, 927–937 (1997).
270. Laupacis, A., Keown, P. A., Ulan, R. A., McKenzie, N. & Stiller, C. R. Cyclosporin A: a powerful immunosuppressant. *Can. Med. Assoc. J.* **126**, 1041–1046 (1982).
271. Dittmann, J., Wenger, R. M., Kleinkauf, H. & Lawen, A. Mechanism of cyclosporin A biosynthesis. Evidence for synthesis via a single linear undecapeptide precursor. *J. Biol. Chem.* **269**, 2841–2846 (1994).
272. Maiya, S., Grundmann, A., Li, S.-M. & Turner, G. The Fumitremorgin Gene Cluster of *Aspergillus fumigatus*: Identification of a Gene Encoding Brevianamide F Synthetase. *ChemBioChem* **7**, 1062–1069 (2006).
273. Rindfleisch, H. & Kleinkauf, H. Biosynthesis of alamethicin. *FEBS Lett.* **62**, 276–280 (1976).
274. Blodgett, J. A., Zhang, J. K., Yu, X. & Metcalf, W. W. Conserved biosynthetic pathways for phosalacine, bialaphos and newly discovered phosphonic acid natural products. *J. Antibiot. (Tokyo)* **69**, 15–25 (2016).
275. Carpaneto, A., Dalla Serra, M., Menestrina, G., Fogliano, V. & Gambale, F. The Phytotoxic Lipodepsipeptide Syringopeptin 25A from *Pseudomonas syringae* pv *syringae* Forms Ion Channels in Sugar Beet Vacuoles. *J. Membr. Biol.* **188**, 237–248 (2002).
276. Süssmuth, R. D. & Mainz, A. Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 3770–3821 (2017).
277. Shou, Q. *et al.* A hybrid polyketide-nonribosomal peptide in nematodes that promotes larval survival. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 770–772 (2016).
278. Richardt, A. *et al.* Ebony, a novel nonribosomal peptide synthetase for beta-alanine conjugation with biogenic amines in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **278**, 41160–41166 (2003).
279. Mullis, M. M., Rambo, I. M., Baker, B. J. & Reese, B. K. Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
280. Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M. & Garbeva, P. The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends Microbiol.* **25**, 280–292 (2017).
281. Holden, V. I. & Bachman, M. A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics* **7**, 986–995 (2015).
282. Pollack, J. R. & Neilands, J. B. Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 989–992 (1970).
283. Hotta, K., Kim, C.-Y., Fox, D. T. & Koppisch, A. T. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains. *Microbiology* **156**, 1918–1925 (2010).
284. Brakhage, A. A. Molecular Regulation of β -Lactam Biosynthesis in Filamentous Fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 547–585 (1998).
285. Schofield, C. J. *et al.* Proteins of the penicillin biosynthesis pathway. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 857–864 (1997).
286. Du, L., Sánchez, C., Chen, M., Edwards, D. J. & Shen, B. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem. Biol.* **7**, 623–642 (2000).
287. Recktenwald, J. *et al.* Nonribosomal biosynthesis of vancomycin-type antibiotics: a heptapeptide backbone and eight peptide synthetase modules. *Microbiol. Read. Engl.* **148**, 1105–1118 (2002).
288. Gonsior, M. *et al.* Biosynthesis of the Peptide Antibiotic Feglymycin by a Linear Nonribosomal Peptide Synthetase Mechanism. *ChemBioChem* **16**, 2610–2614 (2015).
289. Shaw-Reid, C. A. *et al.* Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization. *Chem. Biol.* **6**, 385–400 (1999).

290. Kessler, N., Schuhmann, H., Morneweg, S., Linne, U. & Marahiel, M. A. The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *J. Biol. Chem.* **279**, 7413–7419 (2004).
291. Hoyer, K. M., Mahlert, C. & Marahiel, M. A. The Iterative Gramicidin S Thioesterase Catalyzes Peptide Ligation and Cyclization. *Chem. Biol.* **14**, 13–22 (2007).
292. Felnagle, E. A., Rondon, M. R., Berti, A. D., Crosby, H. A. & Thomas, M. G. Identification of the Biosynthetic Gene Cluster and an Additional Gene for Resistance to the Antituberculosis Drug Capreomycin. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4162–4170 (2007).
293. Thomas, M. G., Chan, Y. A. & Ozanick, S. G. Deciphering Tuberactinomycin Biosynthesis: Isolation, Sequencing, and Annotation of the Viomycin Biosynthetic Gene Cluster. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2823–2830 (2003).
294. Christianson, D. W. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chem. Rev.* **117**, 11570–11648 (2017).
295. Ahmad, M., Wolberg, A. & Kahwaji, C. I. Biochemistry, Electron Transport Chain. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
296. Rodriguez-Concepcion, M. *et al.* A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Prog. Lipid Res.* **70**, 62–93 (2018).
297. Zhou, W. & Guo, D. *Chemical Biology of Sterols, Triterpenoids and Other Natural Products: A Themed Issue in Honor of Professor W. David Nes on the Occasion of His 65th Birthday*. (MDPI, 2019).
298. Manat, G. *et al.* Deciphering the Metabolism of Undecaprenyl-Phosphate: The Bacterial Cell-Wall Unit Carrier at the Membrane Frontier. *Microb. Drug Resist.* **20**, 199–214 (2014).
299. Eichler, J. & Imperiali, B. Stereochemical Divergence of Polyprenol Phosphate Glycosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* **43**, 10–17 (2018).
300. Palsuledesai, C. C. & Distefano, M. D. Protein Prenylation: Enzymes, Therapeutics, and Biotechnology Applications. *ACS Chem. Biol.* **10**, 51–62 (2015).
301. Winkelblech, J., Fan, A. & Li, S.-M. Prenyltransferases as key enzymes in primary and secondary metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 7379–7397 (2015).
302. Elshahawi, S. I. *et al.* Structure and Specificity of a Permissive Bacterial C-Prenyltransferase. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 366–368 (2017).
303. Lombard, J. & Moreira, D. Origins and Early Evolution of the Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in the Three Domains of Life. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 87–99 (2011).
304. Rohmer, M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants†. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 565–574 (1999).
305. Grabińska, K. A., Park, E. J. & Sessa, W. C. *Cis*-Prenyltransferase: New Insights into Protein Glycosylation, Rubber Synthesis, and Human Diseases *. *J. Biol. Chem.* **291**, 18582–18590 (2016).
306. Wallrapp, F. H. *et al.* Prediction of function for the polyprenyl transferase subgroup in the isoprenoid synthase superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E1196–E1202 (2013).
307. Guo, R.-T. *et al.* Crystal structure of octaprenyl pyrophosphate synthase from hyperthermophilic *Thermotoga maritima* and mechanism of product chain length determination. *J. Biol. Chem.* **279**, 4903–4912 (2004).
308. Han, X. *et al.* Crystal Structures of Ligand-Bound Octaprenyl Pyrophosphate Synthase from *Escherichia coli* Reveal the Catalytic and Chain-Length Determining Mechanisms. *Proteins* **83**, 37–45 (2015).
309. Ohnuma, S., Suzuki, M. & Nishino, T. Archaeobacterial ether-linked lipid biosynthetic gene. Expression cloning, sequencing, and characterization of geranylgeranyl-diphosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 14792–14797 (1994).
310. Tachibana, A. *et al.* Novel prenyltransferase gene encoding farnesylgeranyl diphosphate synthase from a hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix*. Molecular evolution with alteration in product specificity. *Eur. J. Biochem.* **267**, 321–328 (2000).
311. Teng, K.-H. & Liang, P.-H. Undecaprenyl diphosphate synthase, a *cis*-prenyltransferase synthesizing lipid carrier for bacterial cell wall biosynthesis. *Mol. Membr. Biol.* **29**, 267–273 (2012).
312. Bohlmann, J. & Keeling, C. I. Terpenoid biomaterials. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **54**, 656–669 (2008).
313. Boutanaev, A. M. *et al.* Investigation of terpene diversification across multiple sequenced plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E81–E88 (2015).
314. Pichersky, E., Noel, J. P. & Dudareva, N. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature’s Diversity and Ingenuity. *Science* **311**, 808–811 (2006).
315. Ashby, M. N., Kutsunai, S. Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A. & Edwards, P. A. COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 4128–4136 (1992).
316. Suvarna, K., Stevenson, D., Meganathan, R. & Hudspeth, M. E. S. Menaquinone (Vitamin K2) Biosynthesis: Localization and Characterization of the menA Gene from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 2782–2787 (1998).
317. Lushchak, V. I. & Semchuk, N. M. Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors. *Acta Physiol. Plant.* **34**, 1607–1628 (2012).

318. Nakagawa, K. *et al.* Identification of UBIAD1 as a novel human menaquinone-4 biosynthetic enzyme. *Nature* **468**, 117–121 (2010).
319. Young, I. G., Leppik, R. A., Hamilton, J. A. & Gibson, F. Biochemical and Genetic Studies on Ubiquinone Biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: 4-Hydroxybenzoate Octaprenyltransferase. *J. Bacteriol.* **110**, 18–25 (1972).
320. Melzer, M. & Heide, L. Characterization of Polyprenyldiphosphate: 4-Hydroxybenzoate Polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1212**, 93–102 (1994).
321. Cheng, W. & Li, W. Structural insights into ubiquinone biosynthesis in membranes. *Science* **343**, 878–881 (2014).
322. Araki, Y. *et al.* Complete biosynthetic pathways of ascofuranone and ascochlorin in *Acremonium egyptiacum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 8269–8274 (2019).
323. Li, C. *et al.* Biosynthesis of LL-Z1272 β : Discovery of a New Member of NRPS-like Enzymes for Aryl-Aldehyde Formation. *ChemBioChem* **17**, 904–907 (2016).
324. Stec, E., Pistorius, D., Müller, R. & Li, S.-M. AuaA, a membrane-bound farnesyltransferase from *Stigmatella aurantiaca*, catalyzes the prenylation of 2-methyl-4-hydroxyquinoline in the biosynthesis of aurachins. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **12**, 1724–1730 (2011).
325. Metzger, U. *et al.* The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14309–14314 (2009).
326. Li, W. Bringing bioactive compounds into membranes: the UbiA superfamily of intramembrane aromatic prenyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 356–370 (2016).
327. Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B. Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* **435**, 983–987 (2005).
328. Pojer, F. *et al.* CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 2316–2321 (2003).
329. Ozaki, T., Mishima, S., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids. *J. Antibiot. (Tokyo)* **62**, 385–392 (2009).
330. Metzger, U., Keller, S., Stevenson, C. E. M., Heide, L. & Lawson, D. M. Structure and mechanism of the magnesium-independent aromatic prenyltransferase CloQ from the clorobiocin biosynthetic pathway. *J. Mol. Biol.* **404**, 611–626 (2010).
331. Kumano, T., Richard, S. B., Noel, J. P., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 8117–8126 (2008).
332. Kuzuyama, T. Biosynthetic studies on terpenoids produced by *Streptomyces*. *J. Antibiot. (Tokyo)* **70**, 811–818 (2017).
333. Jost, M. *et al.* Structure–Function Analysis of an Enzymatic Prenyl Transfer Reaction Identifies a Reaction Chamber with Modifiable Specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17849–17858 (2010).
334. Schuller, J. M. *et al.* Structure and catalytic mechanism of a cyclic dipeptide prenyltransferase with broad substrate promiscuity. *J. Mol. Biol.* **422**, 87–99 (2012).
335. Chen, R. *et al.* Molecular insights into the enzyme promiscuity of an aromatic prenyltransferase. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 226–234 (2017).
336. Tanner, M. E. Mechanistic studies on the indole prenyltransferases. *Nat. Prod. Rep.* **32**, 88–101 (2014).
337. Pockrandt, D., Ludwig, L., Fan, A., König, G. M. & Li, S.-M. New insights into the biosynthesis of prenylated xanthonen: Xptb from *Aspergillus nidulans* catalyses an O-prenylation of xanthonen. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **13**, 2764–2771 (2012).
338. Yu, X. & Li, S.-M. Prenyltransferases of the dimethylallyltryptophan synthase superfamily. *Methods Enzymol.* **516**, 259–278 (2012).
339. Li, S.-M. Applications of dimethylallyltryptophan synthases and other indole prenyltransferases for structural modification of natural products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 631–639 (2009).
340. Orengo, C. A., Sillitoe, I., Reeves, G. & Pearl, F. M. Review: what can structural classifications reveal about protein evolution? *J. Struct. Biol.* **134**, 145–165 (2001).
341. Brandt, W. *et al.* Molecular and structural basis of metabolic diversity mediated by prenyldiphosphate converting enzymes. *Phytochemistry* **70**, 1758–1775 (2009).
342. Fan, A., Winkelblech, J. & Li, S.-M. Impacts and perspectives of prenyltransferases of the DMATS superfamily for use in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 7399–7415 (2015).
343. Mai, P., Coby, L. & Li, S.-M. Different behaviors of cyclic dipeptide prenyltransferases toward the tripeptide derivative ardeemin fumiquinazoline and its enantiomer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 3773–3781 (2019).
344. Winkelblech, J., Xie, X. & Li, S.-M. Characterisation of 6-DMATSMo from *Micromonospora olivasterospora* leading to identification of the divergence in enantioselectivity, regioselectivity and multiple prenylation of tryptophan prenyltransferases. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 9883–9895 (2016).

345. Zhou, K., Wunsch, C., Dai, J. & Li, S.-M. Gem-Diprenylation of Acylphloroglucinols by a Fungal Prenyltransferase of the Dimethylallyltryptophan Synthase Superfamily. *Org. Lett.* **19**, 388–391 (2017).
346. Tsai, H. F., Wang, H., Gebler, J. C., Poulter, C. D. & Schardl, C. L. The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 119–125 (1995).
347. Unsöld, I. A. & Li, S.-M. Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, **151**, 1499–1505 (2005).
348. Grundmann, A. & Li, S.-M. Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiol. Read. Engl.* **151**, 2199–2207 (2005).
349. Wollinsky, B., Ludwig, L., Xie, X. & Li, S.-M. Breaking the regioselectivity of indole prenyltransferases: identification of regular C3-prenylated hexahydropyrrolo[2,3-b]indoles as side products of the regular C2-prenyltransferase FtmPT1. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 9262–9270 (2012).
350. Ding, Y. *et al.* Genome-based Characterization of Two Prenylation Steps in the Assembly of the Stephacidin and Notoamide Anticancer Agents in a Marine-derived *Aspergillus* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12733–12740 (2010).
351. Yin, S., Yu, X., Wang, Q., Liu, X.-Q. & Li, S.-M. Identification of a brevianamide F reverse prenyltransferase BrePT from *Aspergillus versicolor* with a broad substrate specificity towards tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 1649–1660 (2013).
352. Mundt, K. & Li, S.-M. CdpC2PT, a reverse prenyltransferase from *Neosartorya fischeri* with a distinct substrate preference from known C2-prenyltransferases. *Microbiol. Read. Engl.* **159**, 2169–2179 (2013).
353. Zou, H.-X., Xie, X.-L., Linne, U., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. Simultaneous C7- and N1-prenylation of cyclo-L-Trp-L-Trp catalyzed by a prenyltransferase from *Aspergillus oryzae*. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 3037–3044 (2010).
354. Liu, X. & Walsh, C. T. Characterization of cyclo-Acetoacetyl-L-Tryptophan Dimethylallyltransferase in Cyclopiazonic Acid Biosynthesis: Substrate Promiscuity and Site Directed Mutagenesis Studies. *Biochemistry* **48**, 11032–11044 (2009).
355. Unsöld, I. A. & Li, S.-M. Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification, and characterization of fumigaclavine C synthase FGAPT1. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **7**, 158–164 (2006).
356. Liu, C. *et al.* Regiospecificities and Prenylation Mode Specificities of the Fungal Indole Diterpene Prenyltransferases AtmD and PaxD. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 7298–7304 (2013).
357. Kremer, A. & Li, S.-M. A tyrosine O-prenyltransferase catalyzes the first pathway-specific step in the biosynthesis of sirodesmin PL. *Microbiol. Read. Engl.* **156**, 278–286 (2010).
358. Fan, A., Chen, H., Wu, R., Xu, H. & Li, S.-M. A new member of the DMATS superfamily from *Aspergillus niger* catalyzes prenylations of both tyrosine and tryptophan derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 10119–10129 (2014).
359. Yang, X. *et al.* Regiospecific synthesis of prenylated flavonoids by a prenyltransferase cloned from *Fusarium oxysporum*. *Sci. Rep.* **6**, 24819 (2016).
360. Noike, M. *et al.* An enzyme catalyzing O-prenylation of the glucose moiety of fusicoccin A, a diterpene glucoside produced by the fungus *Phomopsis amygdali*. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **13**, 566–573 (2012).
361. Mori, T. *et al.* Manipulation of prenylation reactions by structure-based engineering of bacterial indolactam prenyltransferases. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
362. Pockrandt, D., Sack, C., Kosiol, T. & Li, S.-M. A promiscuous prenyltransferase from *Aspergillus oryzae* catalyzes C-prenylations of hydroxynaphthalenes in the presence of different prenyl donors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 4987–4994 (2014).
363. Chooi, Y.-H., Cacho, R. & Tang, Y. Identification of the Viridicatumtoxin and Griseofulvin Gene Clusters from *Penicillium aethiopicum*. *Chem. Biol.* **17**, 483–494 (2010).
364. Edwards, D. J. & Gerwick, W. H. Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11432–11433 (2004).
365. Awakawa, T. *et al.* A methyltransferase initiates terpene cyclization in teleocidin B biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 9910–9913 (2014).
366. Nelson, D. R. A world of cytochrome P450s. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120430 (2013).
367. Nebert, D. W., Wikvall, K. & Miller, W. L. Human cytochromes P450 in health and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120431 (2013).
368. Lamb, D. C. *et al.* On the occurrence of cytochrome P450 in viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 12343–12352 (2019).
369. Nelson, D. R. Cytochrome P450 diversity in the tree of life. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **1866**, 141–154 (2018).

370. Chen, W. *et al.* Fungal Cytochrome P450 Monooxygenases: Their Distribution, Structure, Functions, Family Expansion, and Evolutionary Origin. *Genome Biol. Evol.* **6**, 1620–1634 (2014).
371. Nelson, D. & Werck-Reichhart, D. A P450-centric view of plant evolution. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **66**, 194–211 (2011).
372. Durairaj, P., Hur, J.-S. & Yun, H. Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microb. Cell Factories* **15**, 125 (2016).
373. Deng, J., Carbone, I. & Dean, R. A. The evolutionary history of Cytochrome P450 genes in four filamentous Ascomycetes. *BMC Evol. Biol.* **7**, 30 (2007).
374. Sezutsu, H., Le Goff, G. & Feyereisen, R. Origins of P450 diversity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **368**, (2013).
375. Manikandan, P. & Nagini, S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr. Drug Targets* **19**, 38–54 (2018).
376. Nebert, D. W. & Russell, D. W. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet Lond. Engl.* **360**, 1155–1162 (2002).
377. Li, Z. *et al.* Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications. *J. Biol. Chem.* **295**, 833–849 (2020).
378. Podust, L. M. & Sherman, D. H. Diversity of P450 enzymes in the biosynthesis of natural products. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1251–1266 (2012).
379. Miller, W. L. Steroidogenesis: Unanswered Questions. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **28**, 771–793 (2017).
380. Sen, A. & Stark, H. Role of cytochrome P450 polymorphisms and functions in development of ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* **25**, 2846–2862 (2019).
381. Zhang, X. & Li, S. Expansion of chemical space for natural products by uncommon P450 reactions. *Nat. Prod. Rep.* **34**, 1061–1089 (2017).
382. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M. & Bernhardt, R. Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 330–344 (2007).
383. Ichinose, H. & Wariishi, H. Heterologous expression and mechanistic investigation of a fungal cytochrome P450 (CYP5150A2): involvement of alternative redox partners. *Arch. Biochem. Biophys.* **518**, 8–15 (2012).
384. Narhi, L. O. & Fulco, A. J. Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **261**, 7160–7169 (1986).
385. Shoun, H. & Takaya, N. Cytochromes P450nor and P450foxy of the fungus *Fusarium oxysporum*. *Int. Congr. Ser.* **1233**, 89–97 (2002).
386. Huang, X. & Groves, J. T. Beyond ferryl-mediated hydroxylation: 40 years of the rebound mechanism and C–H activation. *J. Biol. Inorg. Chem.* **22**, 185–207 (2017).
387. de Montellano, P. R. O. & De Voss, J. J. Oxidizing species in the mechanism of cytochrome P450. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 477–493 (2002).
388. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. (Springer US, 2005).
389. Rudolf, J. D., Chang, C.-Y., Ma, M. & Shen, B. Cytochromes P450 for natural product biosynthesis in *Streptomyces*: sequence, structure, and function. *Nat. Prod. Rep.* **34**, 1141–1172 (2017).
390. Tang, M.-C., Zou, Y., Watanabe, K., Walsh, C. T. & Tang, Y. Oxidative Cyclization in Natural Product Biosynthesis. *Chem. Rev.* **117**, 5226–5333 (2017).
391. Coon, M. J. Cytochrome P450: nature’s most versatile biological catalyst. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 1–25 (2005).
392. Zhang, X., Guo, J., Cheng, F. & Li, S. Cytochrome P450 enzymes in fungal natural product biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* (2021).
393. Luo, Y.-R. *Comprehensive handbook of chemical bond energies*. (CRC Press, 2007).
394. Meunier, B., de Visser, S. P. & Shaik, S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **104**, 3947–3980 (2004).
395. Wong, S. H., Bell, S. G. & Voss, J. J. D. P450 catalysed dehydrogenation. *Pure Appl. Chem.* **89**, 841–852 (2017).
396. *The Treatment of Epilepsy*. (Wiley Blackwell, 2016).
397. Baillie, T. A. Metabolic activation of valproic acid and drug-mediated hepatotoxicity. Role of the terminal olefin, 2-n-propyl-4-pentenoic acid. *Chem. Res. Toxicol.* **1**, 195–199 (1988).
398. Wang, G.-Q. *et al.* Biosynthetic pathway for furanosteroid demethoxyviridin and identification of an unusual pregnane side-chain cleavage. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
399. Ye, Y. *et al.* Fungal-derived brevianamide assembly by a stereoselective semipinacolase. *Nat. Catal.* **3**, 497–506 (2020).
400. García-Estrada, C. *et al.* A Single Cluster of Coregulated Genes Encodes the Biosynthesis of the Mycotoxins Roquefortine C and Meleagrin in *Penicillium chrysogenum*. *Chem. Biol.* **18**, 1499–1512 (2011).

401. Nies, J., Ran, H., Wohlgemuth, V., Yin, W.-B. & Li, S.-M. Biosynthesis of the Prenylated Salicylaldehyde Flavoglucin Requires Temporary Reduction to Salicyl Alcohol for Decoration before Reoxidation to the Final Product. *Org. Lett.* **22**, 2256–2260 (2020).
402. Green, M. R. & Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S., 2012).
403. Fan, J. *et al.* Peniphenone and Penilactone Formation in *Penicillium crustosum* via 1,4-Michael Additions of ortho-Quinone Methide from Hydroxyclovatol to γ -Butyrolactones from Crustolic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 4225–4229 (2019).
404. Zhang, P. *et al.* A cryptic pigment biosynthetic pathway uncovered by heterologous expression is essential for conidial development in *Pestalotiopsis fici*. *Mol. Microbiol.* **105**, 469–483 (2017).
405. Yin, W.-B. *et al.* Discovery of Cryptic Polyketide Metabolites from Dermatophytes Using Heterologous Expression in *Aspergillus nidulans*. *ACS Synth. Biol.* **2**, 629–634 (2013).
406. Mojardín, L. *et al.* Lack of the NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase impairs the function of transcription factors Sip4 and Cat8 required for ethanol utilization in *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet. Biol.* **111**, 16–29 (2018).
407. Jones, E. W. Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. in *Methods in Enzymology* vol. 194 428–453 (Academic Press, 1991).
408. Chiang, Y.-M. *et al.* Development of Genetic Dereplication Strains in *Aspergillus nidulans* Results in the Discovery of Aspercryptin. *Angew. Chem.* **128**, 1694–1697 (2016).
409. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23–28 (1990).
410. Mullis, K. B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci. Am.* **262**, 56–65 (1990).
411. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
412. Blin, K. *et al.* AntiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* **47**, W81–W87 (2019).
413. Blin, K. *et al.* AntiSMASH 2.0—a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res.* **41**, W204–W212 (2013).
414. Solovyev, V., Kosarev, P., Seledsov, I. & Vorobyev, D. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome Biol.* **7**, S10 (2006).
415. Rothstein, R. J. One-step gene disruption in yeast. in *Methods in Enzymology* vol. 101 202–211 (Academic Press, 1983).
416. Asch, D. K. & Kinsey, J. A. Relationship of vector insert size to homologous integration during transformation of *Neurospora crassa* with the cloned am (GDH) gene. *Mol. Gen. Genet. MGG* **221**, 37–43 (1990).
417. Bird, D. & Bradshaw, R. Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **255**, 219–225 (1997).
418. Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W. & Rothstein, R. J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 6354–6358 (1981).
419. Schiestl, R. H. & Petes, T. D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 7585–7589 (1991).
420. Mansour, S. L., Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**, 348–352 (1988).
421. Catlett, N., Lee, B.-N., Yoder, O. & Turgeon, B. Split-Marker Recombination for Efficient Targeted Deletion of Fungal Genes. *Fungal Genet. Rep.* **50**, 9–11 (2003).
422. Lin, C.-H. & Chung, K.-R. Specialized and shared functions of the histidine kinase- and HOG1 MAP kinase-mediated signaling pathways in *Alternaria alternata*, a filamentous fungal pathogen of citrus. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 818–827 (2010).
423. You, B.-J., Lee, M.-H. & Chung, K.-R. Gene-specific disruption in the filamentous fungus *Cercospora nicotianae* using a split-marker approach. *Arch. Microbiol.* **191**, 615–622 (2009).
424. Wunsch, C., Mundt, K. & Li, S.-M. Targeted production of secondary metabolites by coexpression of non-ribosomal peptide synthetase and prenyltransferase genes in *Aspergillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 4213–4223 (2015).
425. Han, K.-H. *et al.* Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.* **41**, 34–40 (2003).
426. Shiotani, H. & Tsuge, T. Efficient gene targeting in the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **248**, 142–150 (1995).
427. Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J. & Stahl, F. W. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**, 25–35 (1983).

428. Lin, T.-S., Chiang, Y.-M. & Wang, C. C. C. Biosynthetic Pathway of the Reduced Polyketide Product Citreoviridin in *Aspergillus terreus* var. *aureus* Revealed by Heterologous Expression in *Aspergillus nidulans*. *Org. Lett.* **18**, 1366–1369 (2016).
429. Ma, K. *et al.* Characterization and Biosynthesis of a Rare Fungal Hopane-Type Triterpenoid Glycoside Involved in the Antistress Property of *Aspergillus fumigatus*. *Org. Lett.* **21**, 3252–3256 (2019).
430. Fan, J., Liao, G., Ludwig-Radtke, L., Yin, W.-B. & Li, S.-M. Formation of Terrestric Acid in *Penicillium crustosum* Requires Redox-Assisted Decarboxylation and Stereoisomerization. *Org. Lett.* **22**, 88–92 (2020).
431. Xiang, P., Ludwig-Radtke, L., Yin, W.-B. & Li, S.-M. Isocoumarin formation by heterologous gene expression and modification by host enzymes. *Org. Biomol. Chem.* **18**, 4946–4948 (2020).
432. Zheng, L., Wang, H., Fan, A. & Li, S.-M. Oxepinamide F biosynthesis involves enzymatic D-aminoacyl epimerization, 3H-oxepin formation, and hydroxylation induced double bond migration. *Nat. Commun.* **11**, (2020).
433. Zheng, L. *et al.* Ustethylin Biosynthesis Implies Phenethyl Derivative Formation in *Aspergillus ustus*. *Org. Lett.* **22**, 7837–7841 (2020).
434. Watanabe, A. *et al.* Re-identification of *Aspergillus nidulans* wA gene to code for a polyketide synthase of naphthopyrone. *Tetrahedron Lett.* **40**, 91–94 (1999).
435. Huang, Y. L. *et al.* Benzaldehyde derivatives from a marine-derived fungus *Aspergillus* sp. *中草药 Chin. Tradit. Herb. Med.* **43**, 837–840 (2012).
436. Nayak, T. *et al.* A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557–1566 (2006).
437. Massengo-Tiassé, R. P. & Cronan, J. E. Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1507–1517 (2009).
438. Schwarzer, P. *et al.* Early Steps in the Biosynthetic Pathway of Rishirilide B. *Molecules* **25**, 1955 (2020).
439. Shimakata, T. & Stumpf, P. K. Purification and characterization of β -ketoacyl-ACP reductase, β -hydroxyacyl-ACP dehydrase and enoyl-ACP reductase from *Spinacia oleracea* leav. *Arch Biochem Biophys* **218**, 77–91 (1982).
440. Dunwell, J. M., Purvis, A. & Khuri, S. Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* **65**, 7–17 (2004).
441. Myobatake, Y. *et al.* Cytotoxic Alkylated Hydroquinone, Phenol, and Cyclohexenone Derivatives from *Aspergillus violaceofuscus* Gasperini. *J. Nat. Prod.* **77**, 1236–1240 (2014).
442. Bok, J. W. *et al.* GliZ, a Transcriptional Regulator of Gliotoxin Biosynthesis, Contributes to *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Infect. Immun.* **74**, 6761–6768 (2006).
443. Cardani, C., Casnati, G., Piozzi, F. & Quilico, A. The constitution of echinulin. *Tetrahedron Lett.* **1**, 1–8 (1959).
444. Wohlgemuth, V., Kindinger, F. & Li, S.-M. Convenient synthetic approach for tri- and tetraprenylated cyclodipeptides by consecutive enzymatic prenylations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 2671–2681 (2018).
445. Kuramochi, K. *et al.* Synthesis and Biological Activities of Neoechinulin A Derivatives: New Aspects of Structure–Activity Relationships for Neoechinulin A. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **56**, 1738–1743 (2008).
446. Dai, Q. *et al.* Total Syntheses of Tardioxopiperazine A, Isoechinulin A, and Variecolorin C. *Org. Lett.* **13**, 2302–2305 (2011).
447. Wagner, S. *et al.* Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14371–14376 (2008).
448. Schenkman, J. B. & Voznesensky, A. I. Interaction Between Cytochrome P450 and Reductase. in *Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes* (eds. Arinç, E., Schenkman, J. B. & Hodgson, E.) 47–63 (Springer, 1995).
449. Ahn, T., Yang, S. & Yun, C.-H. High-level expression of human cytochrome P450 1A2 by co-expression with human molecular chaperone HDJ-1(Hsp40). *Protein Expr. Purif.* **36**, 48–52 (2004).
450. Park, H.-G., Lim, Y.-R., Han, S. & Kim, D. Expression and Characterization of Truncated Recombinant Human Cytochrome P450 2J2. *Toxicol. Res.* **30**, 33–38 (2014).
451. Rawal, S., Yip, S. S. M. & Coulombe, R. A. Cloning, Expression and Functional Characterization of Cytochrome P450 3A37 from Turkey Liver with High Aflatoxin B1 Epoxidation Activity. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 1322–1329 (2010).
452. Barnes, H. J., Arlotto, M. P. & Waterman, M. R. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 α -hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5597–5601 (1991).
453. Cheesman, M. J. *et al.* Soluble and membrane-bound *Drosophila melanogaster* CYP6G1 expressed in *Escherichia coli*: Purification, activity, and binding properties toward multiple pesticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **43**, 455–465 (2013).
454. Haudenschield, C., Schalk, M., Karp, F. & Croteau, R. Functional Expression of Regiospecific Cytochrome P450 Limonene Hydroxylases from Mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **379**, 127–136 (2000).
455. Pan, Y. *et al.* Heterologous Expression of Human Cytochromes P450 2D6 and CYP3A4 in *Escherichia coli* and Their Functional Characterization. *Protein J.* **30**, 581–591 (2011).

456. Tang, Z., Salamanca-Pinzón, S. G., Wu, Z.-L., Xiao, Y. & Guengerich, F. P. Human cytochrome P450 4F11: Heterologous expression in bacteria, purification, and characterization of catalytic function. *Arch. Biochem. Biophys.* **494**, 86–93 (2010).
457. Wang, H. & Strobel, H. W. Regulation of CYP3A9 Gene Expression by Estrogen and Catalytic Studies Using Cytochrome P450 3A9 Expressed in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **344**, 365–372 (1997).
458. Chen, C.-D., Doray, B. & Kemper, B. A Conserved Proline-rich Sequence between the N-terminal Signal-anchor and Catalytic Domains Is Required for Assembly of Functional Cytochrome P450 2C2. *Arch. Biochem. Biophys.* **350**, 233–238 (1998).
459. Kemper, B. Structural basis for the role in protein folding of conserved proline-rich regions in cytochromes P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **199**, 305–315 (2004).
460. Yamazaki, S. *et al.* Importance of the Proline-Rich Region Following Signal-Anchor Sequence in the Formation of Correct Conformation of Microsomal Cytochrome P-450s. *J. Biochem. (Tokyo)* **114**, 652–657 (1993).
461. Hargrove, T. Y., Wawrzak, Z., Lamb, D. C., Guengerich, F. P. & Lepesheva, G. I. Structure-Functional Characterization of Cytochrome P450 Sterol 14 α -Demethylase (CYP51B) from *Aspergillus fumigatus* and Molecular Basis for the Development of Antifungal Drugs. *J. Biol. Chem.* **290**, 23916–23934 (2015).
462. Kim, D., Lim, Y.-R., Ohk, S. O., Kim, B. J. & Chun, Y.-J. Functional expression and characterization of CYP51 from dandruff-causing *Malassezia globosa*. *FEMS Yeast Res.* **11**, 80–87 (2011).
463. Oeda, K., Sakaki, T. & Ohkawa, H. Expression of rat liver cytochrome P-450MC cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Mary Ann Liebert Inc* **4**, 203–210 (1985).
464. Braun, A. *et al.* Steroid biotransformations in biphasic systems with *Yarrowia lipolytica* expressing human liver cytochrome P450 genes. *Microb. Cell Factories* **11**, 106 (2012).
465. Durairaj, P., Jung, E., Park, H. H., Kim, B.-G. & Yun, H. Comparative functional characterization of a novel benzoate hydroxylase cytochrome P450 of *Fusarium oxysporum*. *Enzyme Microb. Technol.* **70**, 58–65 (2015).
466. Nazir, K. H. M. N. H., Ichinose, H. & Wariishi, H. Construction and Application of a Functional Library of Cytochrome P450 Monooxygenases from the Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3147–3150 (2011).
467. Durairaj, P. *et al.* Fungal cytochrome P450 monooxygenases of *Fusarium oxysporum* for the synthesis of ω -hydroxy fatty acids in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Factories* **14**, 45 (2015).
468. Huang, F.-C., Peter, A. & Schwab, W. Expression and Characterization of CYP52 Genes Involved in the Biosynthesis of Sophorolipid and Alkane Metabolism from *Starmerella bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 766–776 (2014).
469. Kasai, N. *et al.* Atypical kinetics of cytochromes P450 catalysing 3'-hydroxylation of flavone from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biochem. (Tokyo)* **147**, 117–125 (2010).
470. Kasai, N. *et al.* Enzymatic properties of cytochrome P450 catalyzing 3'-hydroxylation of naringenin from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**, 103–108 (2009).
471. Mazzaferro, L. S., Hüttel, W., Fries, A. & Müller, M. Cytochrome P450-Catalyzed Regio- and Stereoselective Phenol Coupling of Fungal Natural Products. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 12289–12295 (2015).
472. Song, X. *et al.* Biosynthesis of squalene-type triterpenoids in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of CYP505D13 from *Ganoderma lucidum*. *Bioresour. Bioprocess.* **6**, 19 (2019).
473. Wang, W.-F., Xiao, H. & Zhong, J.-J. Biosynthesis of a ganoderic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by expressing a cytochrome P450 gene from *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol. Bioeng.* **115**, 1842–1854 (2018).
474. van den Brink, H. (J.) M., van Gorcom, R. F. M., van den Hondel, C. A. M. J. J. & Punt, P. J. Cytochrome P450 Enzyme Systems in Fungi. *Fungal Genet. Biol.* **23**, 1–17 (1998).
475. Zöllner, A. *et al.* Production of human phase 1 and 2 metabolites by whole-cell biotransformation with recombinant microbes. *Bioanalysis* **2**, 1277–1290 (2010).
476. Fuller, K. K., Chen, S., Loros, J. J. & Dunlap, J. C. Development of the CRISPR/Cas9 System for Targeted Gene Disruption in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **14**, 1073–1080 (2015).
477. Pohl, C., Kiel, J. A. K. W., Driessen, A. J. M., Bovenberg, R. A. L. & Nygård, Y. CRISPR/Cas9 Based Genome Editing of *Penicillium chrysogenum*. *ACS Synth. Biol.* **5**, 754–764 (2016).
478. Zhang, Y., Ouyang, L., Nan, Y. & Chu, J. Efficient gene deletion and replacement in *Aspergillus niger* by modified in vivo CRISPR/Cas9 systems. *Bioresour. Bioprocess.* **6**, 4 (2019).
479. de Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J. & Beijersbergen, A. G. M. *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* **16**, 839–842 (1998).
480. Michielse, C. B., Hooykaas, P. J. J., van den Hondel, C. A. M. J. J. & Ram, A. F. J. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr. Genet.* **48**, 1–17 (2005).
481. Geib, E., Baldeweg, F., Doerfer, M., Nett, M. & Brock, M. Cross-Chemistry Leads to Product Diversity from Atro- mentin Synthetases in *Aspergilli* from Section *Nigri*. *Cell Chem. Biol.* **26**, 223–234.e6 (2019).

482. Liu, J., Xie, X. & Li, S.-M. Guanitrypmycin Biosynthetic Pathways Imply Cytochrome P450 Mediated Regio- and Stereospecific Guaninyl-Transfer Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 11534–11540 (2019).
483. Huang, C. *et al.* Molecular basis of dimer formation during the biosynthesis of benzofluorene-containing atypical angucyclines. *Nat. Commun.* **9**, 2088 (2018).
484. Khaldi, N., Collemare, J., Lebrun, M.-H. & Wolfe, K. H. Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. *Genome Biol.* **9**, R18 (2008).
485. Wenzl, P., Wong, L., Kwang-won, K. & Jefferson, R. A. A functional screen identifies lateral transfer of beta-glucuronidase (gus) from bacteria to fungi. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 308–316 (2005).
486. Wisecaver, J. H. & Rokas, A. Fungal metabolic gene clusters—caravans traveling across genomes and environments. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
487. Jacob, S. *et al.* Unravelling the biosynthesis of pyriculol in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Microbiology* **163**, 541–553 (2017).
488. Zhao, Z., Ying, Y., Hung, Y.-S. & Tang, Y. Genome Mining Reveals *Neurospora crassa* Can Produce the Salicylaldehyde Sordarial. *J. Nat. Prod.* **82**, 1029–1033 (2019).
489. Zhou, H., Li, Y. & Tang, Y. Cyclization of aromatic polyketides from bacteria and fungi. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 839–868 (2010).
490. Wang, S. *et al.* Functional Characterization of the Biosynthesis of Radicol, an Hsp90 Inhibitor Resorcylic Acid Lactone from *Chaetomium chiversii*. *Chem. Biol.* **15**, 1328–1338 (2008).
491. Kashima, T., Takahashi, K., Matsuura, H. & Nabeta, K. Biosynthesis of Resorcylic Acid Lactone (5<I>S</I>)-5-Hydroxylasiodiplodin in <I>Lasiodiplodia theobromae</I>. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2522–2524 (2009).
492. Reeves, C. D., Hu, Z., Reid, R. & Kealey, J. T. Genes for the Biosynthesis of the Fungal Polyketides Hypothemycin from *Hypomyces subiculosus* and Radicol from *Pochonia chlamydosporia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5121–5129 (2008).
493. Punt, P. J. *et al.* Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* gpdA gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* **93**, 101–109 (1990).
494. Athenstaedt, K. & Daum, G. 1-Acyldihydroxyacetone-phosphate Reductase (Ayr1p) of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Encoded by the Open Reading Frame YIL124w Is a Major Component of Lipid Particles. *J. Biol. Chem.* **275**, 235–240 (2000).
495. Du, L. & Lou, L. PKS and NRPS release mechanisms. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 255–278 (2010).
496. Wang, M., Beissner, M. & Zhao, H. Aryl-aldehyde Formation in Fungal Polyketides: Discovery and Characterization of a Distinct Biosynthetic Mechanism. *Chem. Biol.* **21**, 257–263 (2014).
497. Read, J. A. & Walsh, C. T. The Lyngbyatoxin Biosynthetic Assembly Line: Chain Release by Four-Electron Reduction of a Dipeptidyl Thioester to the Corresponding Alcohol. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 15762–15763 (2007).
498. McMillan, D. G. G. *et al.* Protein–Protein Interaction Regulates the Direction of Catalysis and Electron Transfer in a Redox Enzyme Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 10550–10556 (2013).
499. Sasso, S. *et al.* Structure and function of a complex between chorismate mutase and DAHP synthase: efficiency boost for the junior partner. *EMBO J.* **28**, 2128–2142 (2009).
500. Thattai, M., Burak, Y. & Shraiman, B. I. The Origins of Specificity in Polyketide Synthase Protein Interactions. *PLoS Comput. Biol.* **3**, (2007).
501. Weissman, K. J. Probing Interactions in Fungal PKS. *Chem. Biol.* **20**, 1089–1091 (2013).
502. Xu, W., Qiao, K. & Tang, Y. Structural Analysis of Protein-Protein Interactions in Type I Polyketide Synthases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, (2013).
503. Brunmark, A. & Cadenas, E. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 435–477 (1989).
504. Zang, L.-Y., Stone, K. & Pryor, W. A. Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 161–167 (1995).
505. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Reactive species can be poisonous: Their role in toxicology. Free Radicals in Biology and Medicine* (Oxford University Press, 2015).
506. Alfaro, C., Urios, A., González, M. C., Moya, P. & Blanco, M. Screening for metabolites from *Penicillium novae-zeelandiae* displaying radical-scavenging activity and oxidative mutagenicity: isolation of gentisyl alcohol. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **539**, 187–194 (2003).
507. Martínez, A., Urios, A. & Blanco, M. Mutagenicity of 80 chemicals in *Escherichia coli* tester strains IC203, deficient in OxyR, and its oxyR+ parent WP2 uvrA/pKM101: detection of 31 oxidative mutagens. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **467**, 41–53 (2000).
508. Holdom, M. D., Hay, R. J. & Hamilton, A. J. The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. *Infect. Immun.* **64**, 3326–3332 (1996).

509. Paris, S. *et al.* Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **71**, 3551–3562 (2003).
510. Song, Y. & Buettner, G. R. Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 919–962 (2010).
511. Buettner, G. R. In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals. *J. Biochem. Biophys. Methods* **16**, 27–40 (1988).
512. Li, Y., Kuppusamy, P., Zweier, J. L. & Trush, M. A. ESR evidence for the generation of reactive oxygen species from the copper-mediated oxidation of the benzene metabolite, hydroquinone: role in DNA damage. *Chem. Biol. Interact.* **94**, 101–120 (1995).
513. Li, Y. B. & Trush, M. A. Oxidation of Hydroquinone by Copper: Chemical Mechanism and Biological Effects. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 346–355 (1993).
514. Mandal, S., Kazmi, N. H. & Sayre, L. M. Ligand dependence in the copper-catalyzed oxidation of hydroquinones. *Arch. Biochem. Biophys.* **435**, 21–31 (2005).
515. Rich, P. R. Electron transfer reactions between quinols and quinones in aqueous and aprotic media. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **637**, 28–33 (1981).
516. Segura-Aguilar, J. & Lind, C. On the mechanism of the Mn³⁺-induced neurotoxicity of dopamine: Prevention of quinone-derived oxygen toxicity by DT diaphorase and superoxide dismutase. *Chem. Biol. Interact.* **72**, 309–324 (1989).
517. Matsuda, Y. & Abe, I. Biosynthesis of fungal meroterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **33**, 26–53 (2015).
518. Saeki, H. *et al.* An Aromatic Farnesyltransferase Functions in Biosynthesis of the Anti-HIV Meroterpenoid Daurichromenic Acid. *Plant Physiol.* **178**, 535–551 (2018).
519. Zhang, W. *et al.* Compartmentalized biosynthesis of mycophenolic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 13305–13310 (2019).
520. Peters, C., Frasson, D., Sievers, M. & Buller, R. Novel Old Yellow Enzyme Subclasses. *ChemBioChem* **20**, 1569–1577 (2019).
521. Kelly, P. P. *et al.* Ene Reductase Enzymes for the Aromatisation of Tetralones and Cyclohexenones to Naphthols and Phenols. *Adv. Synth. Catal.* **358**, 731–736 (2016).
522. Schittmayer, M. *et al.* Old Yellow Enzyme-Catalyzed Dehydrogenation of Saturated Ketones. *Adv. Synth. Catal.* **353**, 268–274 (2011).
523. Maggio-Hall, L. A., Lyne, P., Wolff, J. A. & Keller, N. P. A single acyl-CoA dehydrogenase is required for catabolism of isoleucine, valine and short-chain fatty acids in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 180–189 (2008).
524. Bradshaw, R. E. *et al.* Fragmentation of an aflatoxin-like gene cluster in a forest pathogen. *New Phytol.* **198**, 525–535 (2013).
525. Doray, B., Chen, C.-D. & Kemper, B. N-Terminal Deletions and His-Tag Fusions Dramatically Affect Expression of Cytochrome P450 2C2 in Bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **393**, 143–153 (2001).
526. Ichinose, H., Hatakeyama, M. & Yamauchi, Y. Sequence modifications and heterologous expression of eukaryotic cytochromes P450 in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **120**, 268–274 (2015).
527. Ichinose, H. & Wariishi, H. High-level heterologous expression of fungal cytochrome P450s in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**, 289–294 (2013).
528. Hausjell, J., Halbwirth, H. & Spadiut, O. Recombinant production of eukaryotic cytochrome P450s in microbial cell factories. *Biosci. Rep.* **38**, (2018).
529. Wu, Z.-L. *et al.* Enhanced bacterial expression of several mammalian cytochrome P450s by codon optimization and chaperone coexpression. *Biotechnol. Lett.* **31**, 1589–1593 (2009).
530. Liu, F., Yang, H., Wang, L. & Yu, B. Biosynthesis of the High-Value Plant Secondary Product Benzyl Isothiocyanate via Functional Expression of Multiple Heterologous Enzymes in *Escherichia coli*. *ACS Synth. Biol.* **5**, 1557–1565 (2016).
531. Minerdi, D. *et al.* Expression and role of CYP505A1 in pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1868**, 140268 (2020).
532. Heinemann, I. U., Jahn, M. & Jahn, D. The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **474**, 238–251 (2008).
533. Lu, H.-Y. *et al.* Optimization of heme precursors for the expression of human cytochrome P450 2A13 and its co-expression with oxidoreductase in baculovirus/sf9 system. *J. Biochem. (Tokyo)* **153**, 555–563 (2013).
534. Miura, M. *et al.* The Effect of 5-Aminolevulinic Acid on Cytochrome P450-Mediated Prodrug Activation. *PLOS ONE* **10**, e0131793 (2015).
535. Chadha, S. *et al.* Genome-wide analysis of cytochrome P450s of *Trichoderma* spp.: annotation and evolutionary relationships. *Fungal Biol. Biotechnol.* **5**, 12 (2018).
536. Nelson, D. R. The Cytochrome P450 Homepage. *Hum. Genomics* **4**, 59 (2009).
537. Park, J. *et al.* Fungal cytochrome P450 database. *BMC Genomics* **9**, 402 (2008).

538. Gondry, M. *et al.* Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 414–420 (2009).
539. Gondry, M. *et al.* Cyclic dipeptide oxidase from *Streptomyces noursei*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1712–1721 (2001).
540. Lautru, S., Gondry, M., Genet, R. & Pernodet, J.-L. The Albonoursin Gene Cluster of *S. noursei*: Biosynthesis of Diketopiperazine Metabolites Independent of Nonribosomal Peptide Synthetases. *Chem. Biol.* **9**, 1355–1364 (2002).
541. Belin, P. *et al.* The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 961–979 (2012).
542. Giessen, T. W., von Tesmar, A. M. & Marahiel, M. A. Insights into the Generation of Structural Diversity in a tRNA-Dependent Pathway for Highly Modified Bioactive Cyclic Dipeptides. *Chem. Biol.* **20**, 828–838 (2013).
543. Mikulski, L., Schäfer, J., Brockmeyer, K., Kraut, R. & Li, S.-M. Comparative studies on similarities and differences of cyclodipeptide oxidases for installation of C–C double bonds at the diketopiperazine ring. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**, 2523–2536 (2020).
544. Gao, S.-S., Naowarajna, N., Cheng, R., Liu, X. & Liu, P. Recent examples of α -ketoglutarate-dependent mononuclear non-haem iron enzymes in natural product biosyntheses. *Nat. Prod. Rep.* **35**, 792–837 (2018).
545. Witwinowski, J. *et al.* Study of bicyclomycin biosynthesis in *Streptomyces cinnamoneus* by genetic and biochemical approaches. *Sci. Rep.* **9**, 20226 (2019).
546. Yin, W.-B., Xie, X.-L., Matuschek, M. & Li, S.-M. Reconstruction of pyrrolo[2,3-b]indoles carrying an α -configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using recombinant enzymes. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 1133–1141 (2010).
547. Yu, X., Liu, Y., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. Biochemical characterization of indole prenyltransferases: filling the last gap of prenylation positions by a 5-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus clavatus*. *J. Biol. Chem.* **287**, 1371–1380 (2012).
548. Winkelblech, J. *et al.* Tryptophan C5-, C6- and C7-Prenylating Enzymes Displaying a Preference for C-6 of the Indole Ring in the Presence of Unnatural Dimethylallyl Diphosphate Analogues. *Adv. Synth. Catal.* **357**, 975–986 (2015).
549. Kremer, A. & Li, S.-M. Potential of a 7-dimethylallyltryptophan synthase as a tool for production of prenylated indole derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**, 951–961 (2008).
550. Barajas, J. F., Blake-Hedges, J. M., Bailey, C. B., Curran, S. & Keasling, Jay. D. Engineered polyketides: Synergy between protein and host level engineering. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2**, 147–166 (2017).

Anhang

Anhang 1: ^1H -NMR-Spektren der isolierten Substanzen der Echinulin-Familie

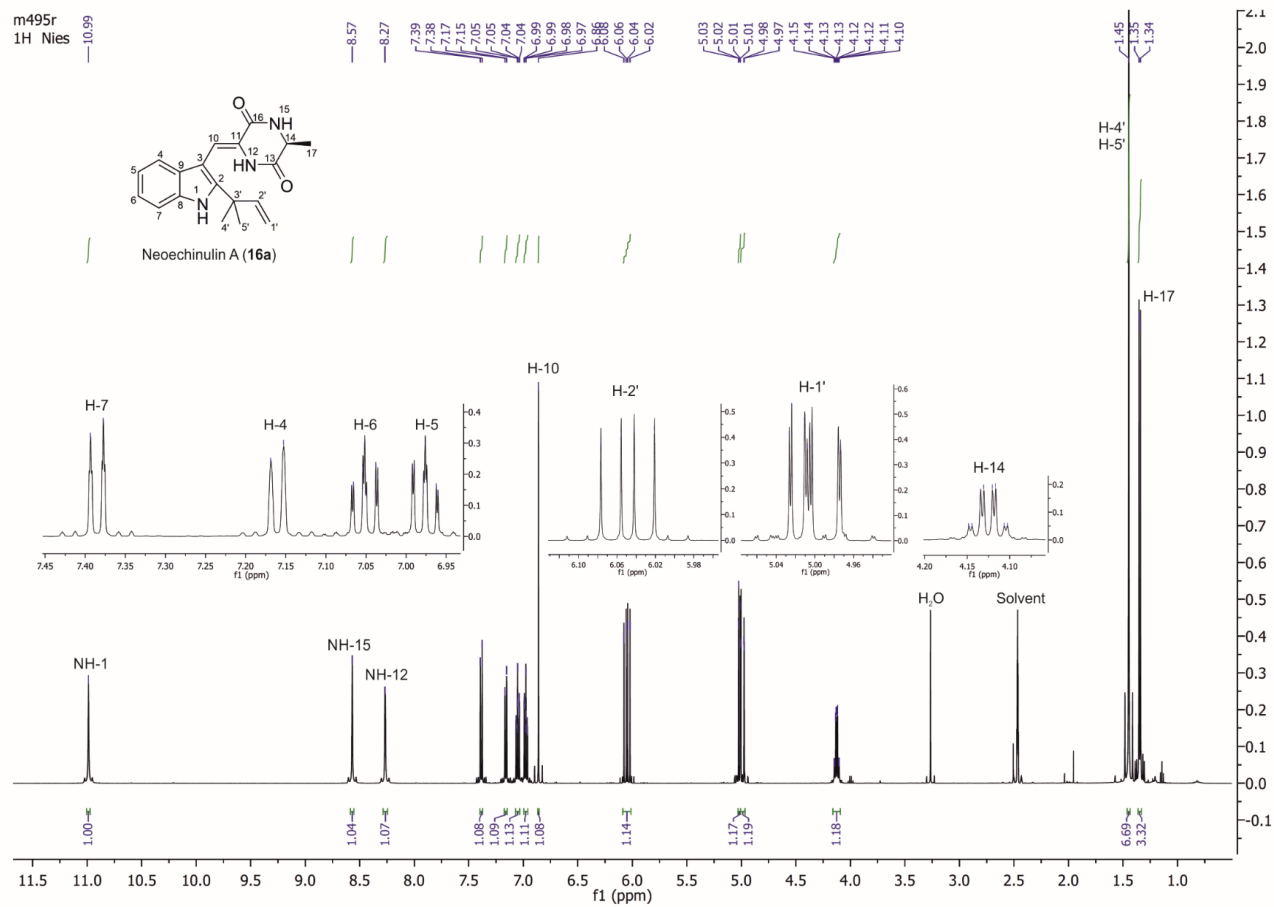


Abbildung 99: ^1H -NMR-Spektrum von 16a in $\text{DMSO}-d_6$ (500 MHz)

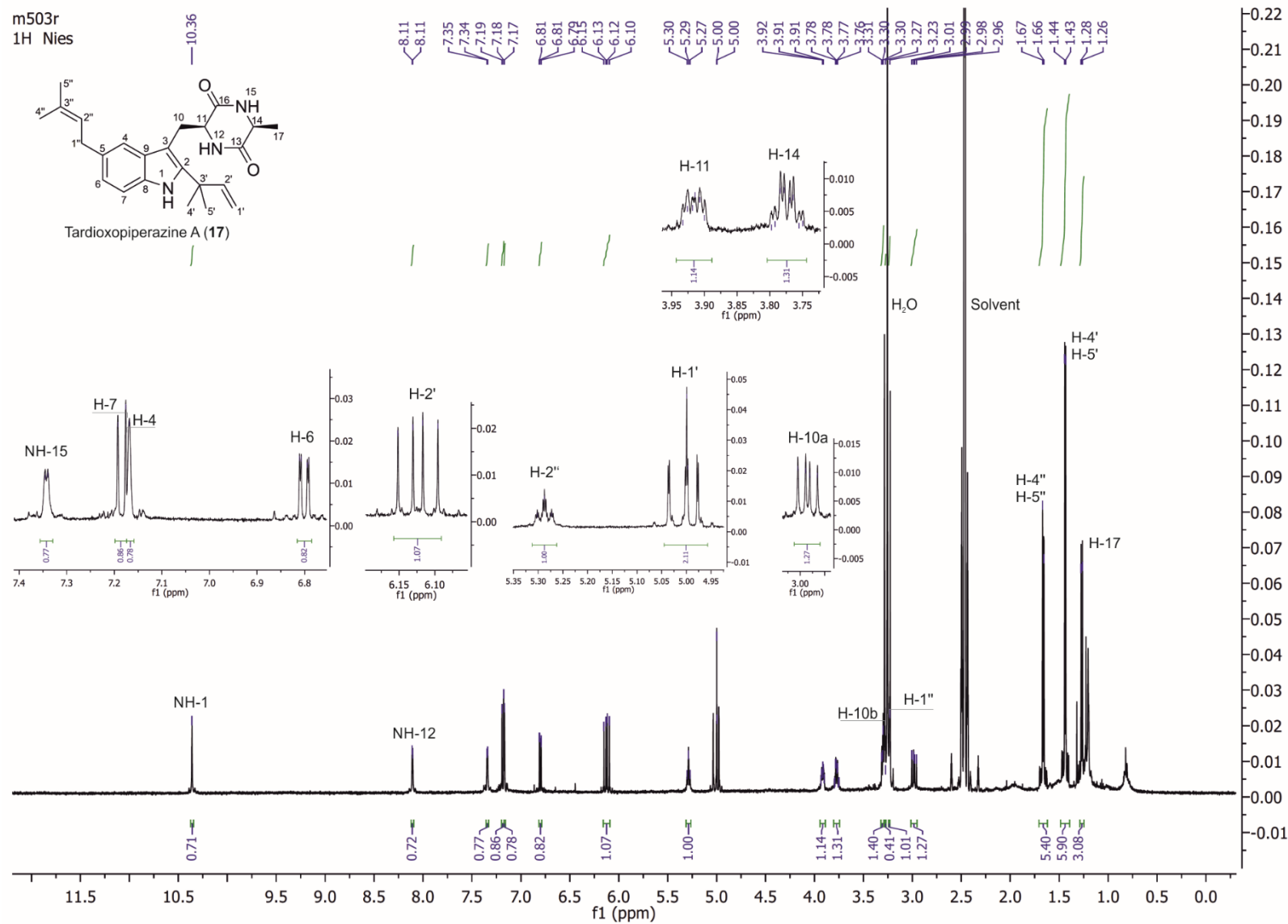
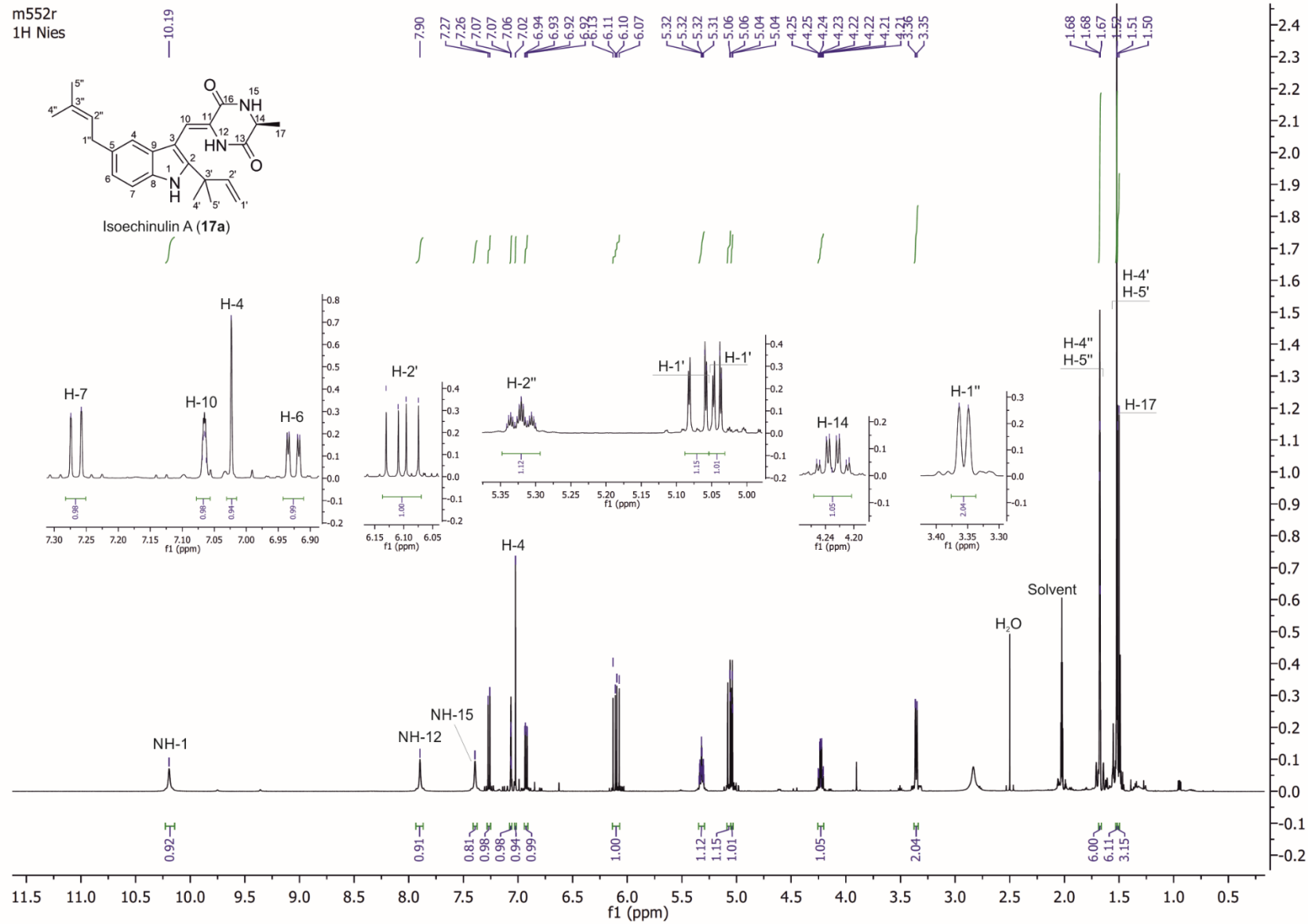


Abbildung 100: ¹H-NMR-Spektrum von 17 in DMSO-*d*₆ (500 MHz)

Abbildung 101: ^1H -NMR-Spektrum von 17a in $\text{DMSO}-d_6$ (500 MHz)

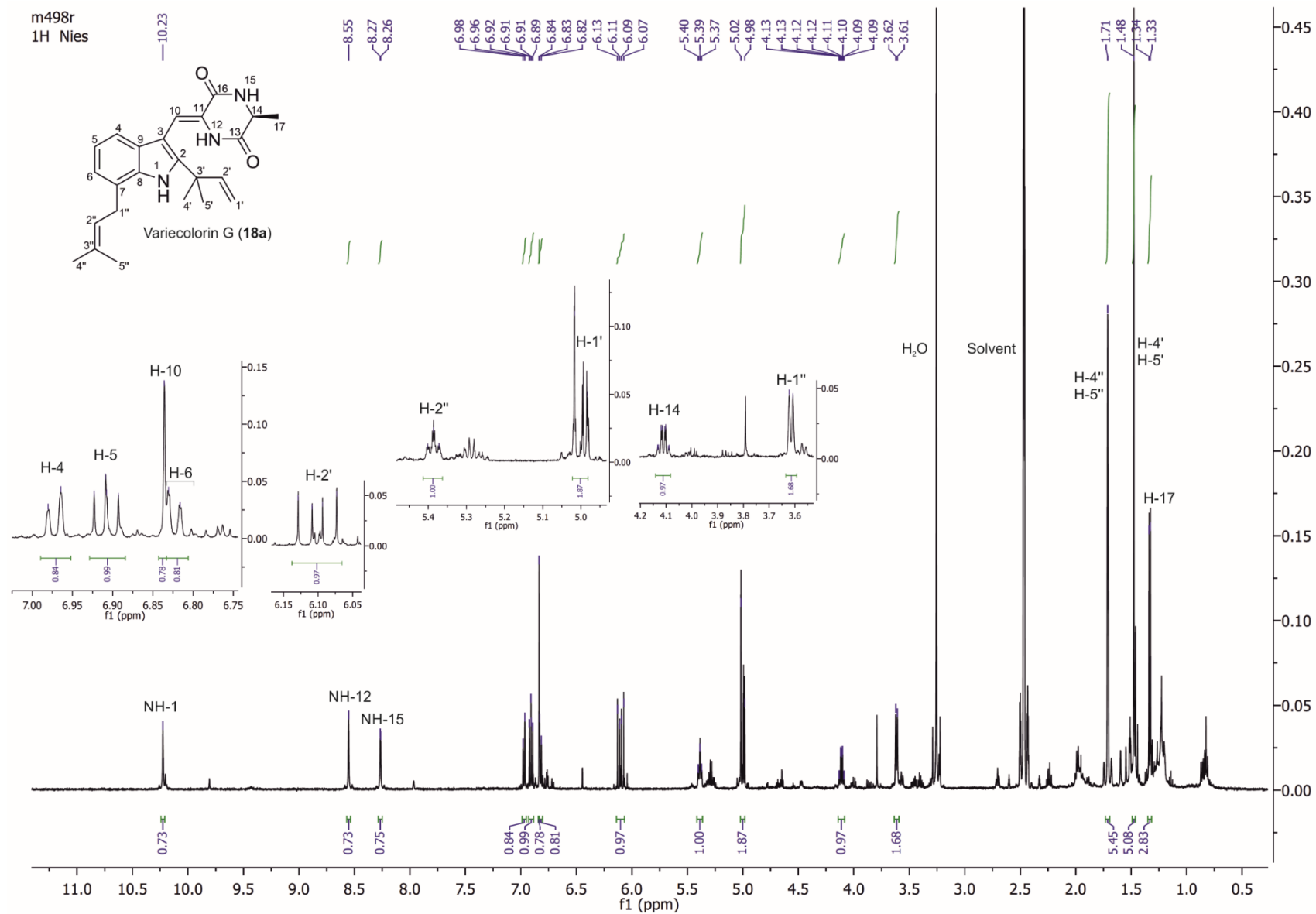
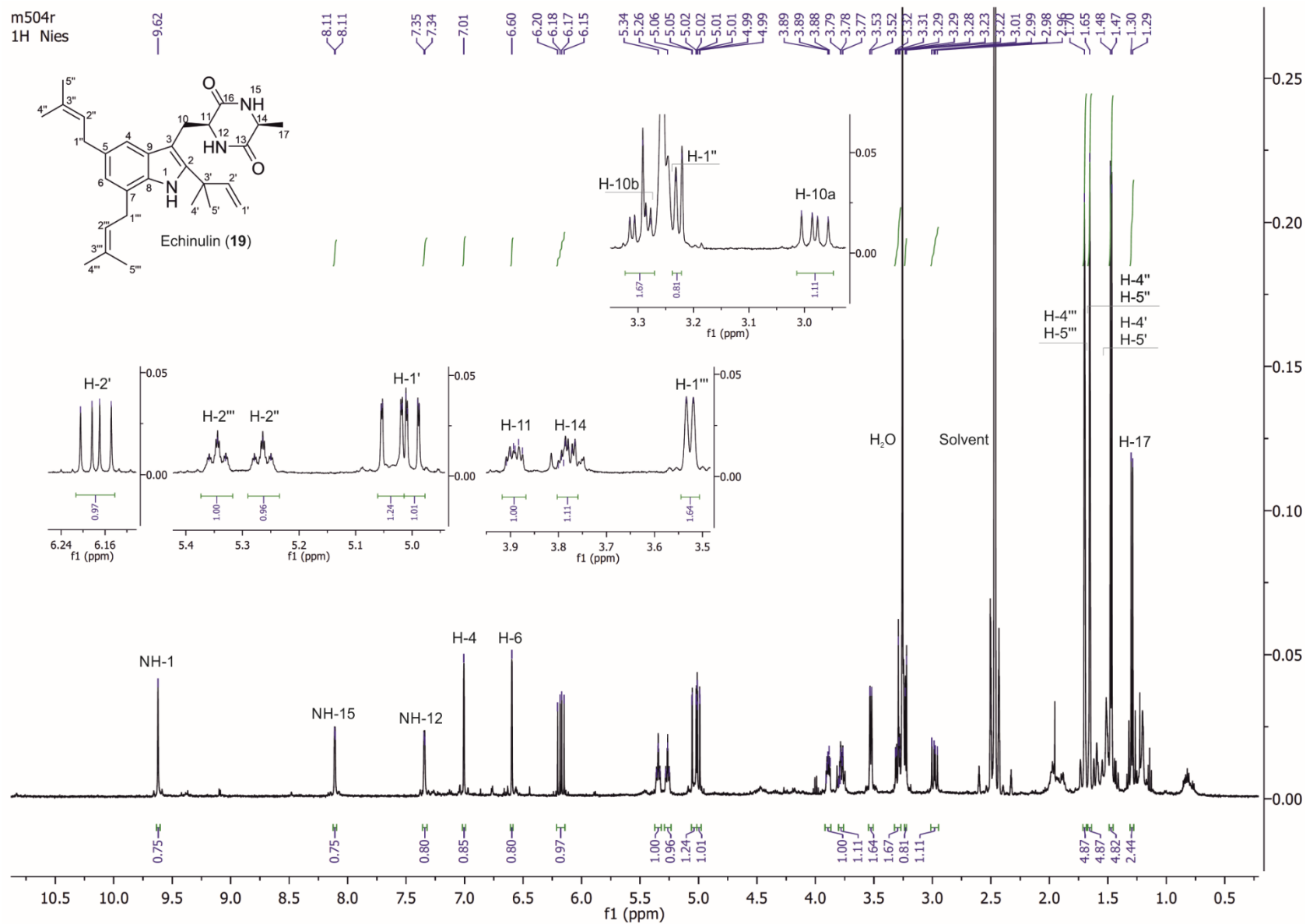


Abbildung 102: ¹H-NMR-Spektrum von 18a in DMSO-*d*₆ (500 MHz)

Abbildung 103: ^1H -NMR-Spektrum von 19 in $\text{DMSO}-d_6$ (500 MHz)

Anhang 2: LC-MS Analysen von Substanzen der Echinulin-Familie

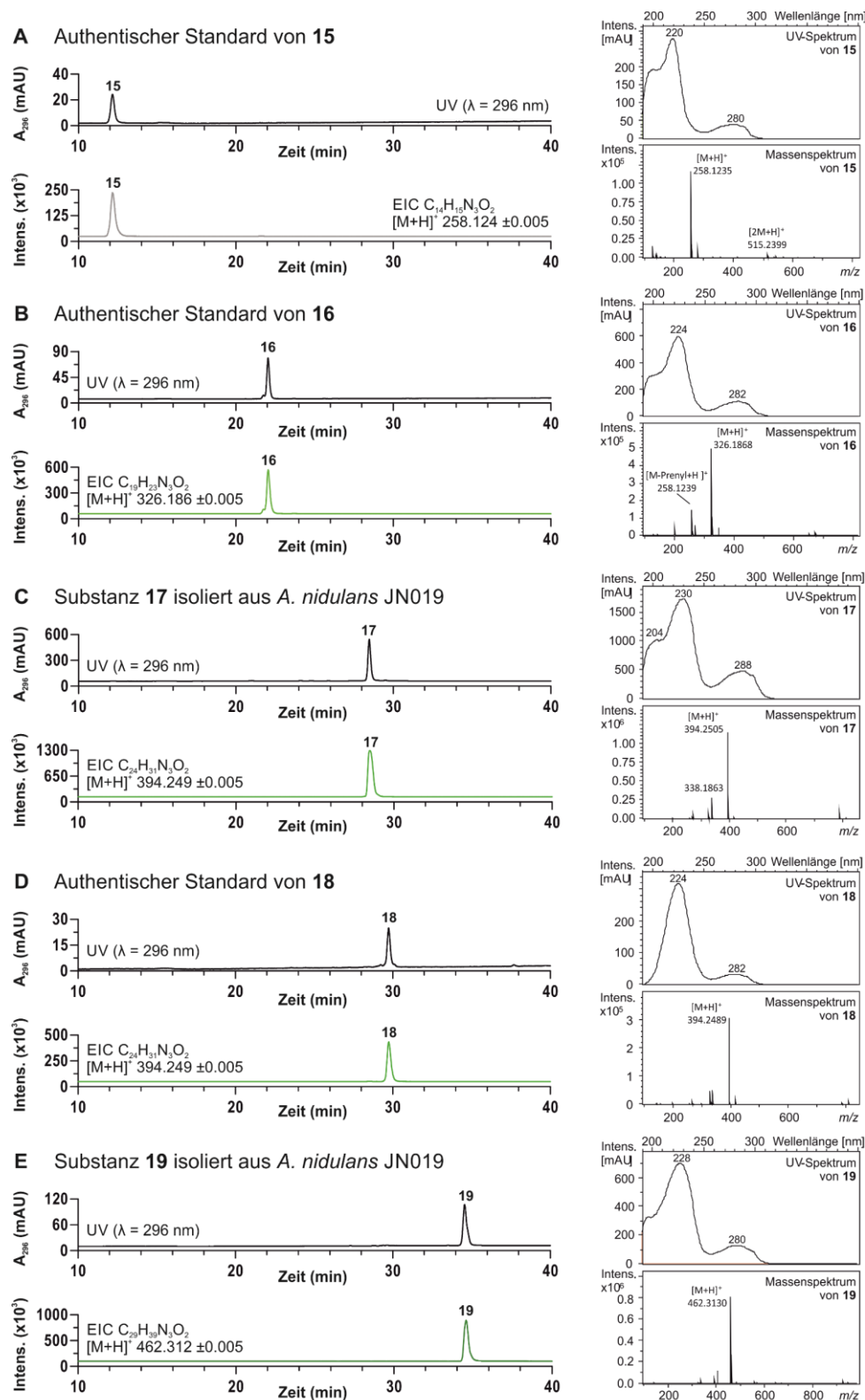


Abbildung 104: LC-MS Analysen von 15 – 19 mit UV- und Massenspektren

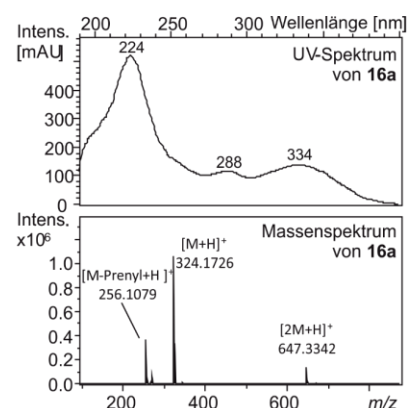
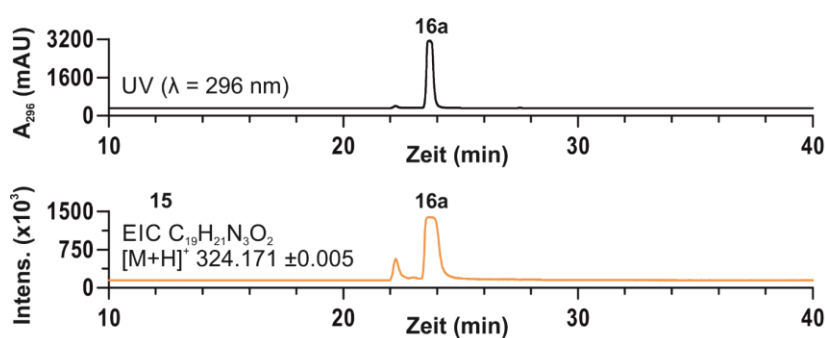
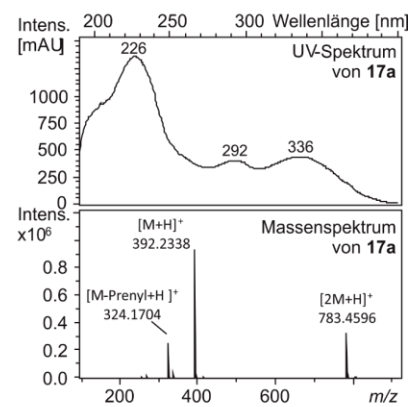
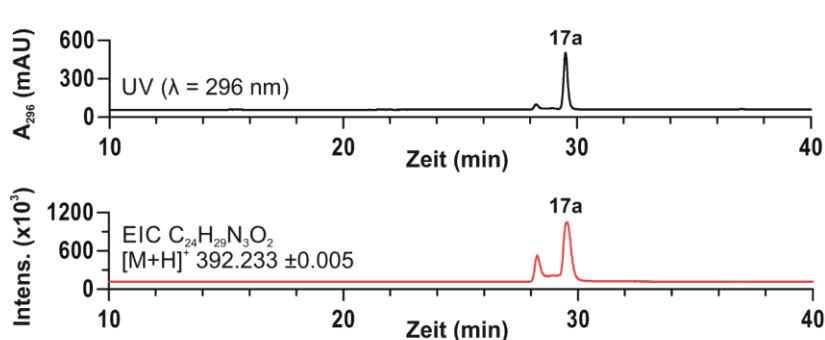
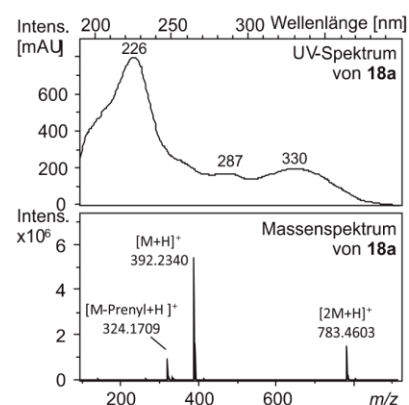
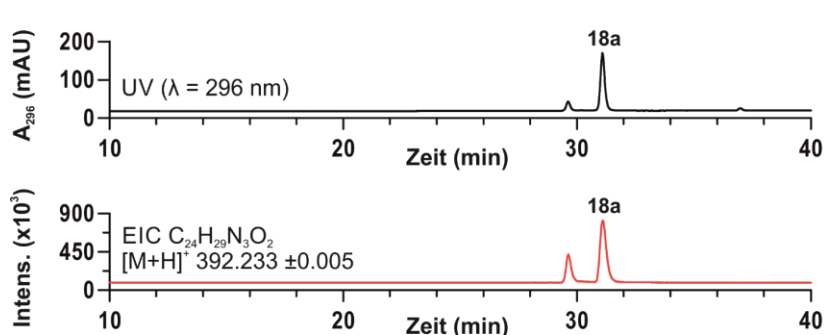
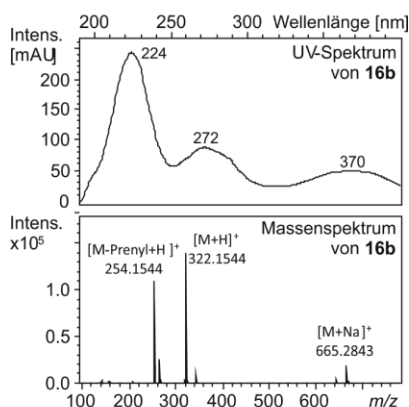
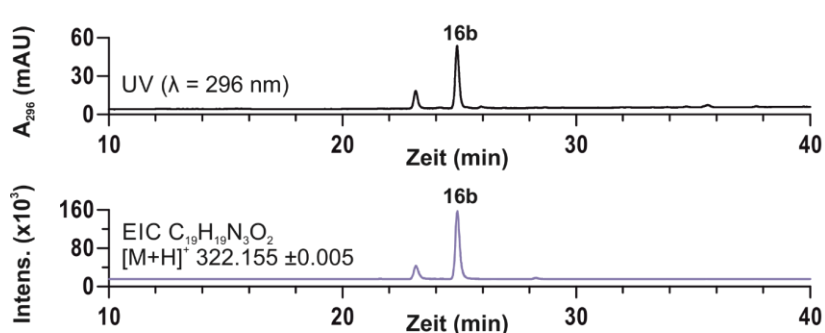
A Substanz **16a** isoliert aus *A. nidulans* JN019**B** Substanz **17a** isoliert aus *A. nidulans* JN019**C** Substanz **18a** isoliert aus *A. nidulans* JN019**D** Authentischer Standard von **16b**

Abbildung 105: LC-MS Analysen von 16a – 18a und 16b mit UV- und Massenspektren

Anhang 3: HPLC-Analysen der Substanzen 16, 19, 16a und 17a als Standards

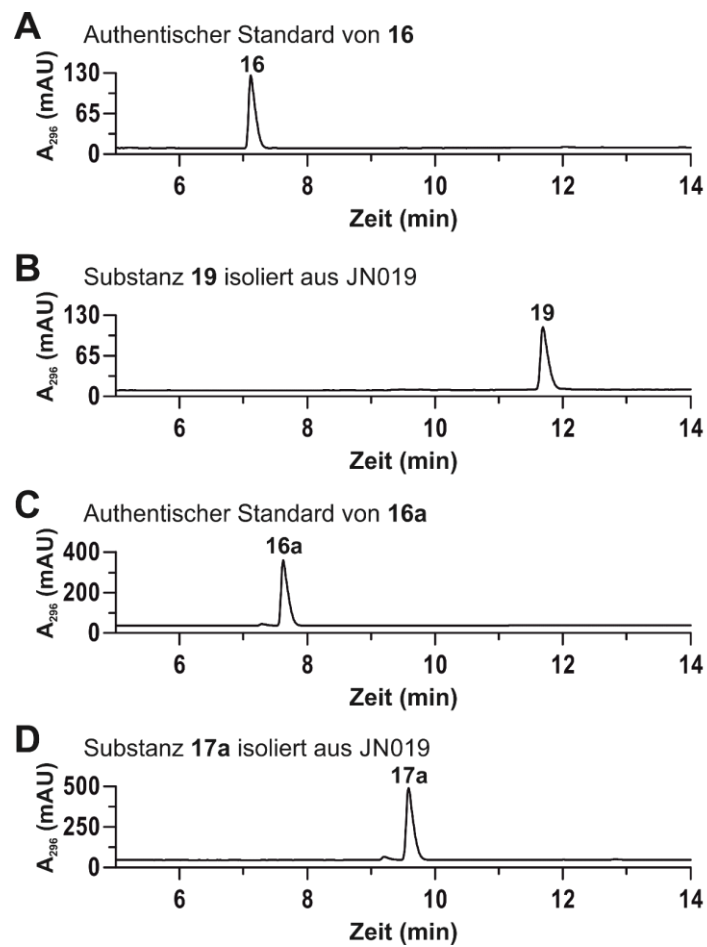


Abbildung 106: HPLC-Analysen der Substanzen 16, 19, 16a und 17a als Standard für die *in vitro*-Enzymassays mit EchPT2

"Die Seite 222 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung."

Danksagungen

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Shu-Ming Li für seine Rolle als Doktorvater, die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas und die große Hilfsbereitschaft bei Fragen und Diskussionsbedarf. Ich konnte mich jederzeit mit Problemen, Erfolgen oder zur Führung wissenschaftlicher Diskussionen an ihn wenden. Er war stets an meinem Fortschritt interessiert und gab mir viele hilfreiche Tips. Dabei ließ er mir aber immer noch die Freiheit eigene Ideen zu entwickeln und eigenen Lösungsansätzen für Probleme zu folgen. Außerdem möchte ich ihm für die Gelegenheit danken auf den Irseer Naturstofftagen 2019 einen Teil meiner Forschung zu präsentieren und in der wissenschaftlichen Community Kontakte zu knüpfen. Ich bin Herrn Prof. Li zutiefst dankbar, dass ich im Rahmen eines wissenschaftlichen Austauschs die Möglichkeit bekam China, seine Kultur und dadurch viele nette Menschen kennen zu lernen. Aus diesem Grund gilt mein Dank auch Herrn Prof. Dr. Wen-Bing Yin, der meinen Kollegen Basti und mich während dieser Zeit in seiner Arbeitsgruppe willkommen hieß. Während unserer Arbeit in Peking haben wir sehr viel gelernt und hatten sehr viel Spass.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

My heartfelt gratitude goes especially to Dr. Huomiao Ran who was the perfect collaborateur. I could not have wished for a better partner to join forces with to work on the flavoglucan project. Her experience and knowledge in natural product chemistry and -isolation complemented my biological know-how and after a while we formed an optimal synergy. Thank you, Miao.

Bei Frau Viola Wohlgemuth und Herrn Dr. Florian Kindinger bedanke ich mich für die praktische und teils auch theoretische Einarbeitung ins Labor. Beide haben mir viel beigebracht und ihre bioinformatische oder praktische Erfahrung mit *A. ruber* und den PTs des *ech*-Pathways haben viel zu den Erfolgen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Frau Rixa Kraut und Frau Lena Ludwig-Radtke für die Aufnahme der LC-MS-Daten und für die Einarbeitung in deren Auswertung. Außerdem möchte ich ihnen für diverse chemische Synthesen danken, ohne die ich teilweise keine Substrate zum Testen meiner Enzyme oder zum Füttern meiner Pilze gehabt hätte. Bei Herrn Stefan Newel und Frau Dr. Regina Ortmann bedanke ich mich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Johann Heider für die Beratung beim Curve-Fit für die Substratinhibition von EchPT2.

Ein großes Dankeschön geht an Bastian Kemmerich, mit dem ich über viele Jahre ein Büro, ein Labor und für unseren Aufenthalt in China auch ein Hotelzimmer teilte. Florian Kindinger möchte ich an dieser Stelle nochmals danken. Mit Basti und Flo hatte ich sowohl im Labor als auch außerhalb der Arbeit eine Menge Spass. Ohne euch beide wäre diese Zeit nur halb so schön gewesen.

Außerdem danke ich Johanna „JoJo“ Schäfer, deren Freundschaft mir schon einige finstere Tage im Labor erhellte. Ohne ihr Organisationstalent und ihre Bereitschaft sehr oft auch „in den sauren Apfel zu beißen“ wäre wahrscheinlich nicht nur ich schlechter dran gewesen. In diesem Zusammenhang danke ich auch Lena „Len“ Mikulski, die mich zusammen mit Johanna durch ihre Besuche in unserem Labor immer wieder davor bewahrt hat zu tief in der Arbeit zu versinken.

Herrn Dr. Lennart Poppe und Frau Dr. Julia Wohl möchte ich auch für die schöne Zeit danken, die schon am ersten Arbeitstag mit dem Essen einer Orange begann.

Des Weiteren danke ich all meinen damaligen und gegenwärtigen Kollegen Alex, Peter, Kirsten, Julia, Nina, Katja, Elisabeth, Kristin, Lindsay, Pan, Liujuan, Huili, Jie, Kang, Linus, Ge, Jinlin, Jing, Jenny, Lauritz, Sina, Daniel J., Daniel O., Andi, Marlies, Haowen, Wen, Yiling, Daisy und Yu für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die großartigen individuellen Momente.

Natürlich bedanke ich mich auch bei meinen Korrekturlesern Lukas K., meinem Bruder Lukas, Bastian Kemmerich und Johanna Schäfer, die sich extra dafür Zeit genommen haben, einen wesentlichen Beitrag dazu zu leisten, dass diese Arbeit textlich so fehlerfrei wie möglich ist.

Zuletzt möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei meinen Eltern, Großeltern und meinem Bruder bedanken, die mich fortwährend unterstützten und immer für mich da waren. Vielen vielen Dank euch allen, ihr seid großartig!!

Einverständniserklärung

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die vorliegende Arbeit

„Untersuchungen zur Biosynthese von Flavoglaucin, Echinulin und ihren Analoga im Ascomyceten *Aspergillus ruber*“

in Bibliotheken allgemein zugänglich gemacht wird. Dazu gehört, dass sie

- von der Bibliothek der Einrichtung, in der ich meine Arbeit angefertigt habe, zur Benutzung in ihren Räumen bereitgehalten wird;
- in konventionellen und maschinenlesbaren Katalogen, Verzeichnissen und Datenbanken verzeichnet wird;
- der UB für lokale Nutzung und für Fernleihe zur Verfügung steht;
- im Rahmen der urheberrechtlichen Bestimmungen für Kopierzwecke genutzt werden kann.

Marburg, den 21.04.2021

(Unterschrift der Autorin/des Autors)

(Unterschrift der betreuenden Hochschullehrerin
bzw. des betreuenden Hochschullehrers)